

# Les glandes operculaires de la petite Vive, *Trachinus vipera* C.V. (Téléostéen, Trachinoidea, Trachinidae) II - Étude histochimique et histoenzymologique

Claude Perrière\* et Catherine Michel\*\*

\* Laboratoire de Biologie animale appliquée

Université Paris-Sud - Centre d'Études pharmaceutiques

92296 Châtenay-Malabry France et Station Biologique 29211 Roscoff France

\*\*\* INSERM U 239, Faculté Xavier Bichat

16, rue Henri Huchard 75018 Paris France

Résumé : L'étude cytologique des glandes venimeuses portées par l'opercule chez *Trachinus vipera* est envisagée sur les plans histochimique et histoenzymologique. En microscopie optique, trois types de structures peuvent être observés dans les "glandes venimeuses" : il s'agit du cytoplasme des grandes cellules glandulaires, de grandes vacuoles contenues dans ces cellules et surtout dans le tissu de soutien, et des cellules dégénérantes contenant des granules.

Les constituants (glucides et protéines) ont été caractérisés à ces trois niveaux. Puis des activités enzymatiques y ont été recherchées *in situ*. Les grandes cellules dont le cytoplasme constitue vraisemblablement la majorité du venin injecté lors d'une piqûre, contiennent essentiellement de la phosphatase acide. Les cellules dégénérantes renferment également une grande quantité de B-glucuronidase et de cytochrome-oxydase. La recherche des activités enzymatiques a été complétée par une méthode biochimique semi-quantitative. Une hypothèse sur la constitution du venin est formulée.

Abstract : Histochemical and histoenzymological detection of venomous cells constituents was purchased *in situ*, in *Trachinus vipera* venom glands of the opercular bone : great glandular cells cytoplasm, vacuoles containing secretion in these cells and granules were observed by mean of optical microscopy.

Glucids and proteins were characterized. Enzymatic activities were detected in situ and in venom with a biochemical micromethod of analysis: acid-phosphatase was demonstrated in great cells cytoplasm and in granules, which contain also  $\beta$ -glucuronidase and cytochromoxidase. Hypothesis about venom constitution was proposed.

## INTRODUCTION

Le travail que nous présentons concerne les glandes venimeuses operculaires de la petite Vive, *Trachinus vipera* G et V. (Perciforme, Trachinoidea, Trachinidae) commune sur nos plages (Lewis, 1980), bien que de distribution non uniforme. Relativement facile à récolter, soit au moyen d'un chalut, soit à pied sur les plages de sable où, du fait de son mode de vie benthique (Lewis, 1976) elle provoque fréquemment des piqûres douloureuses pouvant entraîner des conséquences désagréables, voire même fâcheuses, pour les pêcheurs ou les baigneurs. Outre son intérêt en tant que Poisson venimeux, la petite Vive offre l'avantage de pouvoir être gardée en survie au laboratoire (Perrière, 1980).

L'étude histochimique des glandes venimeuses de Poissons n'a pratiquement pas été entreprise : à ce jour, deux articles seulement portent sur ce sujet (Izumikawa, 1960 ; Cameron & Endean, 1966). Cela tient, sans doute, aux difficultés rencontrées

dans l'obtention des échantillons, la préparation des pièces et la faible intensité des résultats obtenus dans les colorations. Les méthodes de recherche devront être fournies par d'autres travaux portant, en particulier, sur l'épiderme de Poissons (Albanèse Carmignani & Zaccone, 1975 ; Bianchi, 1975 ; Bullock *et al*, 1976 ; Zaccone, 1979 ; Mittal *et al*, 1980) ou sur les glandes venimeuses d'animaux appartenant à des groupes zoologiques variés : parmi ceux-ci, citons seulement les revues de Halstead (1970) ou les études sur les venins d'Invertébrés marins (Michel & Keil, 1975), d'abeille (Habermann, 1968) ou de serpents (Boquet, 1957, et ses collaborateurs 1966, 1970...).

Nous chercherons dans un premier temps à caractériser les constituants de la sécrétion (glucides et protéines) dans la glande operculaire, puis nous nous intéresserons à la présence éventuelle de 5-hydroxytryptamine, donnée comme abondante dans le venin de *Trachinus vipera* par Carlisle (1962). Enfin, nous effectuerons une recherche histoenzymologique sur les glandes, complétée par la recherche des activités enzymatiques du venin prélevé.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les Vives sont conservées au laboratoire, dans de bonnes conditions de survie (Perrière, 1980), puisque la reproduction persiste dans l'élevage.

Les Poissons sont anesthésiés par le MS 222 (Laboratoires Sandoz). Pour l'étude histologique, les opercules sont détachés et immédiatement placés dans le fixateur retenu, dans lequel est effectuée la dissection.

#### ÉTUDE HISTOCHIMIQUE

##### *Recherche des glucides*

La recherche des glucides a été effectuée après fixation au formol-calcium de Baker, aux liquides de Carnoy ou de Gendre. Les méthodes de détection utilisées sont rappelées dans le tableau I.

##### *Recherche des protéines*

Cette recherche est résumée dans le tableau II. Les réactions ont été effectuées sur des échantillons fixés aux liquides de Susa ou de Carnoy, car ces fixateurs permettent une bonne conservation des tissus glandulaires au cours de la dissection, ce qui n'a pas été possible avec les fixations au formol salé, plus habituellement utilisées pour la détection des protéines. Le formol-calcium de Baker a été occasionnellement employé, car les pièces traitées par ce fixateur ont présenté, avec une fréquence plus grande que dans les autres liquides, certains constituants des glandes [en particulier, les granules, contenus dans les cellules de type V (Perrière, 1985 ; Perrière & Michel, à publier)].

Certaines réactions ont été réalisées sur coupes semi-fines (Michel *et al.* 1973, 1983) de tissus fixés au glutaraldéhyde - osmium pour la microscopie électronique.

#### *Essai de caractérisation de la 5-hydroxytryptamine*

La réaction argentaffine au nitrate d'argent ammoniacal (Masson, 1914) a été faite sur des coupes semi-fines (Michel *et al.* 1983).

La réaction de Gibbs (1927) au dichloro 2,6 quinone chloroimide, préparée selon la méthode de Gomori (1948 a) a été mise en œuvre sur des pièces fixées au formol-calcium de Baker.

Nous avons également utilisé une méthode histochimique récente et sensible : la méthode à l'acide glyoxylique de De La Torre et Surgeon (1976), modifiée par De La Torre (1980) :

- les glandes disséquées dans de l'eau de mer filtrée sont coupées au cryostat à - 30° C (15 à 25 µm d'épaisseur). Les coupes sont recueillies sur lames ;
- les lames sont trempées trois fois une seconde à température ambiante dans la solution suivante :

.Sucrose.....	10,2 g
.KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> monobasique.....	4,8 g
. Acide glyoxylique (monohydrate) (SIGMA).....	1,5 g
. Eau distillée.....	qsp 100 ml

ajustée à pH 7,4 par de la soude 1 N. Le volume est enfin complété à 150 ml avec de l'eau distillée ;

- la solution en excès est éliminée autour de la coupe ;
- la coupe est entièrement séchée à l'aide d'un séchoir électrique produisant un courant d'air froid ;
- après séchage complet, les coupes sont recouvertes d'une ou deux gouttes d'huile de paraffine très pure (MERCK), puis placées dans une étuve à 95° C pendant 3 minutes ;
- l'huile est éliminée, remplacée par une nouvelle goutte, et les coupes sont recouvertes d'une lamelle, avant d'être observées au microscope à fluorescence (Nikon Biophot pour fluorescence, filtre d'excitation I.S. 385-425).

#### **DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PAR HISTOENZYMOLOGIE**

Les glandes operculaires sont disséquées dans l'eau distillée, et immédiatement réfrigérées dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Les coupes sont faites au cryostat, à une épaisseur de 10 µm et recueillies sur les lamelles gélatinées.

#### *Techniques histoenzymologiques utilisées :*

- *Phosphatase acide* : méthode de Gomori (1942) ; le substrat est le glycérophosphate de sodium ; incubation : 2 heures à 37° C ; témoin d'activité ; absence de

substrat, ou méthode de Barka (1960) à l' $\alpha$ -naphthyl phosphate de sodium, sur coupes provenant de pièces fixées 24 heures dans du formol 10 % contenant 1 % de chlorure de calcium ajusté à pH 7 avec de la soude 1 N.

- *Phosphatase alcaline* : méthode de Gomori (1939) et Takamatsu (1938, 1939) substrat :  $\alpha$  - glycérophosphate de sodium ; témoin sans substrat ; incubation : 2 heures à 37° C,

ou méthode aux colorants azoïques, couplés (var. Pearse, 1960) substrat :  $\alpha$  - naphthyl de sodium et copulation avec le Fast Red TR.

- *Phosphoamidase* : méthode de Gomori (1948, b) ; substrat ; acide P-Chloroanilido-phosphonique ; témoin sans substrat ; préincubation : 30 minutes à 60° C, incubation : 4 heures à 37° C.

-  $\beta$  • *Glucuronidase* : méthode de Seligman *et al.* (1954) substrat : 6-Bromo-2-Naphthyl- $\beta$  D Glucuronide ; témoin sans substrat, incubation : 2 heures à 37° C.

- *Glucose-6-Phosphatase* : méthode de Chiquoine (1953) ; substrat : Glucose-6-Phosphate disodique ; témoin sans substrat ; incubation : 30 minutes à 37° C.

- *ATPase* : méthode de Wegmann et Bankowski (1960) ; substrat : adénosine-5'-triphosphate ; témoin : inhibition par EDTA 0,006 M ; incubation : 30 minutes à 37° C, pH 8,5.

- *Cytochromoxydase* : méthode de Burstone (1959) ; substrat N-Phenyl-P-Phénylène diamine ; témoin sans substrat ; incubation 60 minutes à la température ambiante.

- *Nad-P-Tétrazolium réductase* : méthode de Scarpelli *et al.* (1958) ; substrat : nicotine amide adénine dinucléotide phosphate réduit ; incubation : 30 minutes à 37° C.

- *Cholinesterases* spécifique et non spécifique : méthode de Koelle et Friedenweld (1949) modifiée par Gerebtzoff (1953) ; substrat: acétylthiocholine (iodure) ou butyrylthiocholine (iodure) ; incubation : 2 heures à 37° C ; témoin : omission du substrat.

- *Upases* : méthode de Gomori (1945, 1946), var. Mark (1950) ; substrat : Tween 80 ; incubation : les coupes effectuées au cryostat sont post-fixées rapidement au formol, avant d'être incubées à 37° C, pendant 4 à 8 heures ; témoin : inactivation au lugol.

- *Protéases* : méthode de Cunningham (1967), modifiée par Michel et Chrétien (1977) ; substrat : gélatine sur lamelles colorées par diazotation ; digestion enzymatique par les coupes faites au cryostat incubées pendant une heure à 37° C, en chambre humide ; coloration au rouge nucléaire solide.

- *Hyaluronidase* : méthode de McCombs et White (1968) (d'après Pearse) ; substrat : hyaluronate de sodium dans un film de gélatine déposé sur lamelles, digestion enzymatique par les coupes posées sur le film, en chambre humide, à 37° C, pendant une heure ; coloration au bleu de toluidine, à pH 7,4.

# DÉTECTION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PAR LA MÉTHODE APIZYM

Il s'agit d'une analyse par une microméthode biochimique semi-quantitative, utilisant des substrats adsorbés sur un support de fibres synthétiques chimiquement inertes, commercialisée sous le nom d'APIZYM (API-SYSTEM, La Balme-les-Grottes, 38390 Montalieu-Vercieu, que nous remercions pour l'envoi gracieux de nouvelles galeries, non encore commercialisées). Ce support est destiné à favoriser le contact entre l'enzyme et le substrat généralement insoluble.

Le venin est aspiré à la seringue à partir des épines operculaires de 2 à 5 Vives, dans de l'eau distillée stérile. La solution est immédiatement répartie dans des séries de cupules contenant les substrats et les tampons nécessaires à la caractérisation des activités enzymatiques. Les activités des phosphatases, des lipases, des glycosidases, et des protéases sont recherchées. Pour cela, chaque cupule reçoit deux gouttes de solution de venin. Les galeries contenant les séries de cupules sont placées pendant 4 heures à l'étuve à 37 °C, puis les activités sont révélées par les réactifs appropriés, conformément au protocole indiqué par le fabricant [tampon tris-amino-méthane et Fast Blue (A + B ou soude)]. Les galeries sont ensuite exposées quelques minutes au rayonnement d'une lampe très puissante (1 000 W) pour éliminer le fond jaune dû à l'excès de Fast Blue (A + B) qui n'a pas réagi. La lecture est effectuée au bout de 5 minutes ; les colorations sont comparées à une échelle colorimétrique, et les intensités notées de 0 à 5.

## ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES GLANDES (Tableaux I et II)

La structure des "glandes venimeuses" a été précisée dans un précédent travail (Perrière, 1985 ; Perrière & Michel, à publier). Rappelons qu'elles comprennent quatre types de constituants cellulaires : l'*épiderme* entoure une capsule conjonctive qui protège la "glande venimeuse" et peut même la fractionner en lobes. Du côté interne, la glande venimeuse est séparée du *tissu conjonctif* par une lame basale de même aspect que la lame basale épidermique, ce qui indique une origine épidermique pour les cellules glandulaires. Des cellules agencées en un *tissu de soutien* pourraient correspondre à de jeunes cellules sécrétrices (types I, II et III) qui évolueraient en *cellules glandulaires de grande taille* (cellules de type IV) puis en cellules de dégénérescence (type V) contenant des granules brun-noir. Des vacuoles de grande taille existent au niveau du tissu de soutien et dans le cytoplasme des grandes cellules (Fig. 1).

L'histochimie s'attachera à trois niveaux :

- les cellules glandulaires (type IV) ;
- les produits d'accumulation contenus dans les vacuoles ;
- les granules contenus dans les cellules de type V.

Le tissu de soutien est peu visible en microscopie optique : l'histochimie ne révèle que le contenu des grandes vacuoles.

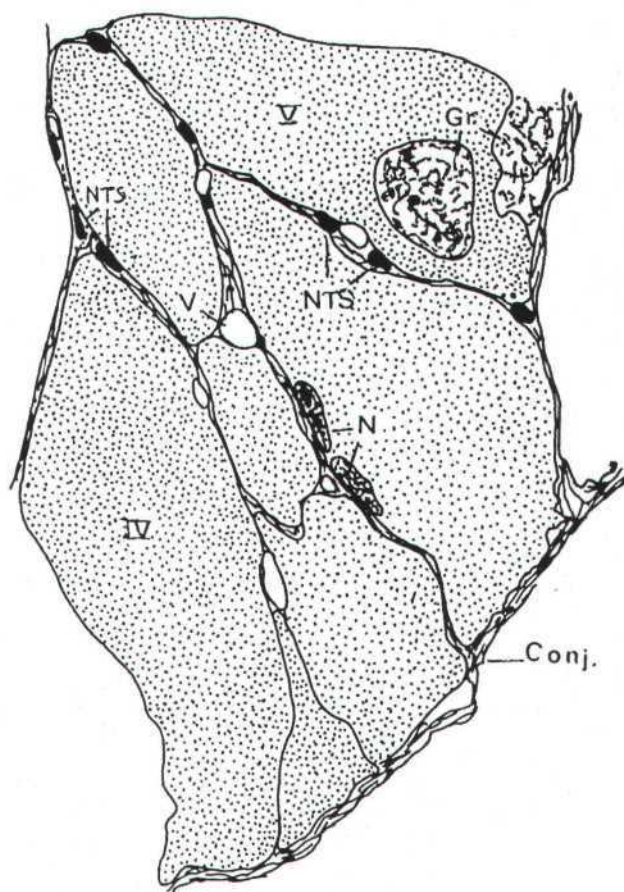


Fig. 1 - Mise en place des différents éléments d'une glande venimeuse observée en microscopie optique : grandes cellules de type IV, avec leur noyau ; cellules de type V avec des amas de granules ; tissu de soutien contenant des noyaux et des vacuoles.

Conj. : tissu conjonctif ; Gr. : granules ; N. : noyau ; NTS : noyau dans le tissu de soutien ; V. : vacuole ; IV : cellules de type IV ; V : cellule de type V.

#### LES GRANDES CELLULES GLANDULAIRES

Le cytoplasme de ces cellules paraît homogène. Sur coupes semi-fines, il se colore en rouge vif dans la coloration à la fuschine basique - bleu de méthyle (Michel *et al.* 1973) dans laquelle les protéines sont colorées de façon signalétique par la fuschine. Le cytoplasme ne répond à aucune des réactions des glucides (Tableau I.). On a pu détecter des groupements  $\text{NH}_2$ , appartenant ou non à des protéines (méthode à la ninhydrine-Schiff) et dont la présence est confirmée par la désamination par l'acide nitreux et le blocage par acétylation, associé ou non à la saponification.



Tableau I : Détection des glucides

- . Dans les cellules glandulaires, les glucides n'ont pu être détectés.
- . Le(s) produit(s) de sécrétion contient(nent) des groupements 1-2 glycols, vraisemblablement sous forme de mucopolysaccharides neutres.
- . Les granules contiennent des polysaccharides acides carboxylés et/ou sulfatés.

REACTIONS	RÉFÉRENCES	FIXATEUR	CELLULES GLANDULAIRES (type IV)	PRODUIT(S) de SECRETION	GRANULES (type V)	INTERPRÉTATION
HIMES et MORIBER	1956	CARNOY	jaune paille	rouge		rouge : glucides jaune : protéines basiques
A.P.S.	MAC MANUS, 1946 HOTCHKISS, 1948	BAKER	-	++	++	1-2-glycols
		GENDRE	-	+++	+++	
Acétylation + A.P.S.	MAC MANUS et CASON 1950	BAKER	-	-	-	
		GENDRE	-	-	-	
Acétylation, saponification + A.P.S.	LILLIE, 1954	BAKER	-			
		GENDRE	-	+++	+++	
- Amylase + A.P.S.	PAEGLE, 1965	CARNOY	-	++		Pas de glycogène
A.P.S. + dimedon	BULMER, 1959	GENDRE	-	-	-	
Bleu alcian, pH 2,5	MOWRY, 1963	BAKER	-	- (CARNOY)	+	Polysaccharides acides
Bleu alcian, pH 0,5	LEV et SPICER 1964	BAKER	-	- (CARNOY)	±	Polysaccharides sulfatés
Méthylation + B.A. pH 2,5	FISCHER et LILLIE 1954	BAKER	-		-	Polysaccharides carboxylés
Méthylation + saponification + bleu alcian pH 2,5		BAKER	-		+	
Bleu alcian pH 2,5 + A.P.S.	MOWRY et WINKLER 1956	CARNOY	-	++ (Rouge)		Mucopolysaccharides - neutres colorés par A.P.S. - acides colorés par B.A.
Jaune alcian pH 2,5	RAVETTO, 1964	BAKER	-	-	± vert	Groupements carboxylés sulfatés (B.A., J.A.)
Bleu alcian pH 0,5		CARNOY	-	-		
Bleu toluidine (métachromasie) pH 4,5 ou 1	LISON, 1960	BAKER	-	-	++ (Met)	Polysaccharides faiblement acides (pH 4,5) à très acides (pH 1)
Sulfatation + bleu de toluidine pH 4,2	KRAMER et WINDRUM 1953, 1954	CARNOY	-	++ (Métachromasie)		+ : polysaccharides neutres
N-N dimethyl paraphenylene diamine chlorhydrate	SPICER et JARRELS, 1961 SPICER, 1965	CARNOY	-	++ (Brun orangé)	± (Noir)	Brun orange = MPS neutres Noir = MPS acides

Une réaction positive à la méthode de Barnett et Seligmann (1958) sur des pièces fixées au Susa, et son contrôle par méthylation suivie de saponification, permet de conclure à la présence de groupements carboxylés propres aux protéines (Tableau II). La tétrazoréaction effectuée sur des coupes à la paraffine et sur coupes semi-fines, détecte la présence d'un mélange de nombreux acides aminés constitutifs des protéines : tyrosine, tryptophane, histidine, lysine, cystéine et/ou arginine. Les blocages associés nous amènent à conclure à la présence en faible quantité de tryptophane et/ou d'arginine (blocage à l'acide performique). La présence de tryptophane est confirmée par la méthode spécifique au rosindole de Glenner (1957), celle de tyrosine assurée par la réaction de type Millon (modifiée par Ganter, 1970) et la diazotation de Morel et Sisley [1927, adaptée par Lillie, 1957 (Tableau II)]. Le cytoplasme présente une faible coloration rose-pâle à la réaction au DDD : il contient quelques groupements sulphydryles (-SH). L'existence de radicaux disulfures (-S-S) est mieux assurée (coloration plus intense au DDD, après blocage des -SH et réduction des -S-S- en -SH par le thiolglycolate). Par ailleurs une réaction positive est observée après la coloration de Pearse au tétrazolium alcalin : la persistance de cette réponse après blocage, suggère la présence d'une substance réductrice, en plus du groupement -SH (5-hydroxytryptamine, adrénaline...) (Tableau II).

#### PRODUITS DE SÉCRÉTION CONTENUS DANS LES VACUOLES

Toutes les vacuoles contenant un produit de sécrétion ont présenté les mêmes colorations aux diverses réactions des polysaccharides effectuées. Elles sont APS-positives, complètement acétylables et saponifiables : il s'agit de radicaux 1-2-glycols présents dans les polysaccharides. Sur les coupes provenant de pièces fixées au Gendre, l'hydrolyse amylasique ne supprime pas la réactivité à l'APS, à l'inverse de ce qui est observé après action du dimédon : il ne s'agit donc pas de glycogène. L'absence de coloration par les phtalocyanines dans la réaction de Ravetto (1964) permet d'éliminer les mucopolysaccharides carboxylés et sulfatés (Tableau I). L'absence de métachromasie au bleu de toluidine (pH 4,5) employé seul, et la présence d'une légère réponse métachromatique après sulfatation, évoquent la présence de polysaccharides neutres, ce qui est confirmé par la technique de Spicer (1965) aux diamines : le chlorhydrate de N-N-diméthyl paraphénylène-diamine fait apparaître des produits de condensation brun-orangé au niveau des aldéhydes formés par oxydation périodique préalable. La méthode de Spicer aux diamines mélangées, avec oxydant et suivie de bleu Alcian pH 2,5 (1965) confirme ces résultats (Tableau I).

Tableau II : Détection des protéines

. Le cytoplasme des cellules glandulaires contient des groupements carboxylés propres aux protéines et un mélange d'acides aminés, où le tryptophane, la tyrosine et les groupements soufrés sont mis en évidence.

. Le (s) produit (s) de sécrétion renferme (nt) les mêmes acides aminés en proportion vraisemblablement plus abondante, puisque la réactivité est nettement plus forte.

. Les granules présentent des intensités faibles à la coloration des protéines ; on y trouve un peu de cystine, et des acides aminés tels que l'histidine, la lysine et/ou l'arginine.



Tableau II : DÉTECTION DES PROTEINES

REACTIONS	RÉFÉRENCES	FIXATEUR	CELLULES GLANDULAIRES (type IV)	PRODUIT(S) de SÉCRÉTION	GRANULES (type V)	INTERPRÉTATION
Ninhydrine-Schiff	YASUMA-ICHIKAWA, 1952-1953	CARNOY	+	-	+ -	Présence de groupements NH <sub>2</sub>
Ac. 2 Hydroxynaphtoiue	BARNETT et SELIGMAN, 1958	SUSA	+ + lie de vin	-		Présence de groupements carboxylés des protéines
Méthylation		SUSA	± bleu clair	-		
Méthylation + Saponification		SUSA	+ bleu violacé	-		
Métrazoréaction	DANIELLI, 1947 (adaptée SF)	SF	+ +	+ + +	+ +	Présence de protéines à groupements Tyr., Try., Hist., Lys., Cys., et/ou Arg.
Blocage au DNFB		SF	±	+ + +	+ +	
Benzoylation		SF	-	99 + -	-	
Acide performique		SF	+	+ + -	-	
DMAB (réaction Rosindole)	GLENNER, 1957	CARNOY	+	+	-	Tryptophane
Blocage (oxydation performique)		CARNOY	-	-		
Diazotation	MOREL et SISLEY adaptée par LILLIE, 1957	CARNOY	+	+ + +		Tyrosine
Réaction type Millon	MILLON, modifiée par GANTER, 1970	CARNOY	+	+ +	-	Tyrosine
Tétrazolium alcalin	PEARSE, 1953	BOUIN	+	+ + +	-	Présence de groupements réducteurs dont éventuellement - SH (Cystéine)
R.S.R.	BENNET, 1951	CARNOY	-	+	-	Réaction non spécifique des - SH
D.D.D.	BARNETT et SELIGMAN, 1952, 1954	CARNOY	(rose pâle)	±	-	Réaction spécifique des -SH
N-éthyl maléimide + DDD		CARNOY	-	-	-	Blocage des -SH
N-éthyl maléimide thioglycolate + DDD		CARNOY	+	+ +	très pâle	Mise en évidence des S-S seuls

Quant aux protéines, nous avons fait les mêmes observations pour les produits de sécrétion que pour le cytoplasme (Tableau II). Ont été détectés :

- . le radical indole (tryptophane),
- . le radical phénol (tyrosine),
- . la cystéine : réaction faible au DDD et réponse fortement positive au tétrazolium alcalin. La méthode au RSR donne également les mêmes indications. Bien que non spécifiques, les deux dernières techniques renforcent notre opinion en faveur de la présence de cystéine dans le produit de sécrétion,
- . la cystine : réaction positive après réduction des -S-S- en -SH, et coloration au DDD.

#### LES GRANULES

Les mêmes méthodes de détection donnent des résultats différents au niveau des granules, en y mettant en évidence l'existence de polysaccharides acides. En particulier, les techniques de Ravetto (1964) et de Spicer (1965) visualisent la présence des groupements carboxylés ou sulfatés. Quelques groupements - NH<sub>2</sub> des protéines ont été détectés (Ninhydrine-Schiff). La tétrazoréaction donne une coloration de même intensité que dans le cytoplasme des grandes cellules, mais cette coloration n'est due, ni au tryptophane (DMAB), ni à la tyrosine (réaction type Millon négative). Les réactions effectuées au niveau des groupement réducteurs confirment la présence d'une faible quantité d'acides aminés soufrés.

#### CONCLUSION PARTIELLE

Nos résultats sont les suivants :

Dans le cytoplasme des grandes cellules, aucun glucide n'a été décelé. On y trouve par contre des protéines portant des groupements amine primaire et carboxyle libres, des radicaux disulfures, des noyaux indole (tryptophane) et phénol (tyrosine).

Les vacuoles des grandes cellules et du tissu de soutien contiennent des produits de sécrétion constitués de polysaccharides neutres (mucopolysaccharides, mucoprotéines et/ou glycoprotéines), des protéines dont les acides aminés dominants seraient le tryptophane, la tyrosine, la cystéine et la cystine, avec parfois des traces d'histidine. Ces vacuoles sont proportionnellement plus nombreuses dans le tissu de soutien, où elles ont été les seules structures détectées par voie histochimique, que dans les grandes cellules (type IV).

Dans les granules (constituants des cellules de type V), des polysaccharides (mucopolysaccharides) acides, portant des groupements sulfatés et carboxylés, ont été caractérisés. Quelques-uns contiennent des groupements -NH<sub>2</sub>. On y décèle un peu de cystine, de l'histidine, de la lysine et/ou de l'arginine.

## ESSAI DE DÉTECTION DE LA 5-HYDROXYTRYPTAMINE ET INTERPRÉTATION

## ESSAI DE CARACTÉRISATION

Les réponses aux réactions histochimiques au niveau du cytoplasme des grandes cellules (type IV) conduisent à envisager l'existence de substances réductrices (5-hydroxytryptamine, adrénaline...) en plus de celle du groupement - SH. Les produits de sécrétion, dans le cytoplasme des cellules de type IV ou de celles du tissu de soutien, contiennent des groupements réducteurs en quantité plus importante. Par contre, de tels groupements n'ont pas été mis en évidence au niveau des granules (méthode de Pearse, 1953). De plus, comme la présence de tryptophane dans les grandes cellules et les produits de sécrétion peut conduire à la synthèse de sérotonine, nous avons cherché à la caractériser de façon plus spécifique, utilisant pour cela trois méthodes différentes.

La réaction argentaffine au nitrate d'argent ammoniacal (Masson, 1914) est décevante sur coupes à la paraffine, aussi avons-nous appliqué cette technique sur coupes semi-fines. Selon Michel *et al.* (1983), la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique renforce les colorations des tissus contenant de la 5-hydroxytryptamine (tétrazoréaction de Danielli, 1947 ; réaction argentaffine de Masson, 1914), ce qui est lié, selon les auteurs, à une meilleure conservation de la sérotonine. L'observation de coupes semi-fines des "glandes venimeuses" de *Trachinus vipera* n'a pas apporté d'arguments décisifs : les colorations obtenues par les différentes méthodes sont peu intenses.

La réaction de Gibbs (1927) au dichloro-2, 6-quinone chloroimide met en évidence la 5-hydroxytryptamine, sous forme d'une coloration noire. Elle est ici négative, ce qui laisse supposer l'absence de sérotonine au niveau des cellules de type IV et des produits de sécrétion accumulés dans ces cellules et dans celles du tissu de soutien, mais n'apporte aucune précision en ce qui concerne les granules contenant naturellement des pigments noirs. Cependant, à leur niveau, l'absence de groupements réducteurs est un argument en faveur de l'absence de 5-HT.

Une confirmation de cette conclusion a été recherchée par la méthode de fluorescence induite à l'acide glyoxylique préconisée par De La Torre et Surgeon (1976, modifiée en 1980), spécifique des monoamines lorsque les conditions de la manipulation sont très strictes. L'observation des clichés confirmera nos remarques : les seuls éléments fluorescents sont mis en évidence au niveau des granules. Leur fluorescence est variable, mais il n'y a pas de différence sensible avec les témoins, préparés sans acide glyoxylique. Autrement dit, la technique mise en œuvre montre, sur les coupes observées en lumière ultraviolette ( $\lambda \# 400$  nm), la présence de substances autofluorescentes que nous ne pouvons identifier. Les différentes intensités de fluorescence peuvent être dues à des substances différentes, ou à des concentrations différentes d'une même sécrétion, ce qui ne permet pas de conclure.

Il n'est pas possible, dans ces conditions, de conclure à l'existence ou à l'absence totale de sérotonine dans les "glandes venimeuses" de *Trachinus vipera*. Peut-être les méthodes utilisées ne sont-elles pas assez sensibles.

## DISCUSSION ET CONCLUSION PARTIELLE

De très nombreux auteurs s'accordent à reconnaître, dans la majorité des venins, l'existence de 5-HT. Les arguments, dont certains sont donnés pour *Trachinus vipera*, sont fournis :

- par la Chromatographie sur papier (ils comparent la migration des fractions du venin et celle de la 5-HT), (Carlisle, 1962) ;
- par la présence de groupements réducteurs,
- par la fluorescence,
- par la douleur provoquée lors de l'injection (Carlisle, 1962).

Nous ne rediscuterons pas les trois premiers points. En ce qui concerne le dernier, selon Russell (1963), la 5-HT est susceptible de provoquer la douleur chez l'Homme, bien que le mécanisme soit inconnu : elle peut provoquer des changements dans la perméabilité des terminaisons nerveuses sensorielles, altérer le transfert des ions vers les sites récepteurs, ou modifier le transport et la distribution de certains ions au niveau des terminaisons nerveuses. Cependant, bien qu'elle contribue sans doute à la production de la douleur causée par une toxine, elle n'est pas la seule responsable de cette souffrance. L'argument chromatographique n'est pas suffisant pour conclure. De plus, l'existence de 5-HT dans le venin de *Trachinus draco* n'a pas été confirmée (Haavaldsen et Fonnum, 1963).

## HISTOENZYMOLOGIE

### RÉSULTATS

Étant donnée l'épaisseur des coupes obtenues à partir de matériel disséqué non fixé et coupé au cryostat, trois types de structures ont pu être observés dans les "glandes venimeuses" :

- . le cytoplasme des grandes cellules, (Type IV) ;
- . les granules, (Type V) ;
- . et accessoirement, le tissu de soutien (Types I, II et III).

Les méthodes utilisées se répartissent en deux groupes : les coupes sont incubées en présence de substrat présent, soit inclus dans un film déposé sur une lame, soit en milieu liquide. Les résultats sont répertoriés dans le tableau III.

Selon ces observations, les activités de la phosphatase acide, de la cytochrome-oxydase et de l'ATPase ont été détectées dans le cytoplasme des grandes cellules ; les granules présentent une plus grande variété d'activités enzymatiques, puisque la phosphatase acide, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -glucuronidase, la glucose-6-phosphatase, la cytochrome-oxydase et la NAD-P-Tétrazolium réductase y ont été caractérisées. Quant au tissu de soutien, nous n'avons pu mettre en évidence à son niveau que de la phosphatase acide, en périphérie des "glandes venimeuses", et de l'ATPase.

Tableau III : Détection des activités enzymatiques par des méthodes histoenzymologiques.

	GRANDES CELLULES	GRANULES	TISSU DE SOUTIEN
Phosphatase acide	++	+++	+ en périphérie des glandes
Phosphatase alcaline	-	+	-
Phosphoamidase	-	-	-
B - glucuronidase	-	++	-
Glucose - 6 - phosphatase	-	+	-
ATPase, pH 8,5	±	-	+++
Cytochrome oxydase	+	++	
NAD – P – Tétrazolium Réductase	+	++	
Cholinestéases	-	-	-
Upases	-	-	-
Protéases (film)	-	-	-
Hyaluronidase (film)	-	-	-

## DISCUSSION

*Critique des manipulations effectuées*

Lors de la dissection, réalisée sur du matériel non fixé, une pression sur la glande a pu se produire, pression qui a pour effet d'expulser du venin. De ce fait, tout ou partie du venin a pu être déplacé. Dans ces conditions, et surtout au niveau des grandes cellules, des résultats négatifs peuvent ne pas correspondre à la réalité. Par ailleurs, en ce qui concerne l'activité protéasique recherchée, il s'agit essentiellement de protéases susceptibles de digérer un film de gélatine, c'est-à-dire éventuellement trypsine, chymotrypsine, mais aussi collagénase. Toutes les incubations ont été initialement réalisées à 37° C, conformément aux protocoles indiqués dans les méthodes citées. Toutefois, en ce qui concerne la phosphatase acide, l'intensité de la réaction a conduit à effectuer d'autres séries expérimentales en diminuant le temps d'incubation et en plaçant les milieux à température ambiante. Dans ces conditions, seules les grandes cellules et surtout les granules ont montré une réaction positive. Cependant, l'essai à 37° C se justifie, compte tenu de l'activité pharmacologique du venin chez les Mammifères.



*Comparaison avec les activités enzymatiques détectées dans d'autres venins de Poissons*

A notre connaissance, aucune étude histoenzymologique n'a été effectuée sur les glandes venimeuses de Poissons. Les seuls travaux qui font état des activités enzymatiques concernent le venin lui-même, fraîchement prélevé ou conservé au froid. Nous en discuterons ultérieurement.

**DÉTECTION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PAR UTILISATION  
DES GALERIES APIZYM**

**ACTIVITÉS DÉTECTÉES**

Plusieurs types de galeries ont été utilisées. Elles permettent de détecter :

- . des phosphatases, parmi lesquelles l'activité de la phosphatase acide et de la phosphoamidase est importante,
- . des lipases, surtout des estérases C<sub>4</sub> et C<sub>8</sub>,
- . des osidases, dont les activités ne sont pas très fortes,
- . des protéases : il n'y a pas eu de réponse positive pour la trypsine ni pour l' $\alpha$ -chymotrypsine, mais parmi les 59 activités des aryl-amidases (aminopeptidases) recherchées, 32 ont été détectées, en quantité variable.

Les tests étant semi-quantitatifs, une estimation des activités peut être donnée (Tableau IV).

**DISCUSSION**

*Techniques utilisées*

La technique utilisée est facile à mettre en œuvre, et ses résultats sont reproductibles, donnant une indication sur la quantité de substrat hydrolysé par les différentes enzymes. Le nombre d'enzymes recherchées est élevé, en comparaison de celles qu'il est possible de détecter par histoenzymologie. Cette méthode, commode, semble aussi plus sensible : parmi les activités communes détectées par les deux méthodes, celles qui ont hydrolysé plus de 20 nM par la méthode API, ont été caractérisées en histoenzymologie. Il faut toutefois remarquer que lorsque l'activité est détectée par histoenzymologie au niveau des seuls granules, la méthode API donne des activités faibles : ceci est un argument en faveur du fait que le venin contient peu de granules.

Pour expliquer cette différence de sensibilité, nous avons évoqué les conditions d'incubation : en effet, si la température d'incubation est la même dans les différentes techniques employées (37° C), la durée varie selon les cas : la mise en évidence des activités enzymatiques par le système API se fait après 4 heures à 37° C ; elle est en général de 2 heures en histoenzymologie. Afin de vérifier l'identité ou la non identité des résultats obtenus, et de connaître la part qui revient à l'incubation, des durées plus longues ont été appliquées (entre 4 heures et une

Tableau IV - Liste des activités enzymatiques détectées par les tests APIZYM, dans un venin operculaire de *Trachinus vipera* fraîchement prélevé.

Quantité de substrat hydrolysé + 5 nM + + + 20 nM 40nM par goutte de venin dilué + + 10 nM + + + + 30 nM + + + +				
NOMS	ENZYMES DÉTECTÉES	SUBSTRAT	REPONSE	
PHOSPHATASES	- Phosphatase alcaline	2 - Naphthyl • Phosphate	+	EC 3-1-3-1
	- Phosphatase acide	2 - Naphthyl - Phosphate	+ + + + +	EC 3-1-3-2
	- Phosphoamidase	2 - Naphtbol - As - Bi - Phosphate	+ + +	EC 3-9-1-1
LIPASES	- Estérases C4 (acétylestérase) (hydrolase)	2 - Naphthyl - Butyrate	+ +	EC 3-1-1-6
	C5	2 - Naphthyl - Valérate	+	
	C6	2 - Naphthyl - Caproate	+	
	C8	2 - Naphthyl - Caprylate	+ +	
	C9	2 - Naphthyl - Nonanoate	+	
	- Estérase - Lipase	2 - Naphthyl - Caprylate	+	
	- Lipase C14 (glycérol ester hydrolase)	2 - Naphthyl - Myrystite	±traces	EC 3-1-1-3
OSIDASES	- β Galactosidase	2 - Naphthyl - βD • Galactopyranoside	+	EC 3-2-1-23
	- β Glucuronidase	Naphthol - As - βi - βd - Glucuronate	+ +	EC 3-2-1-3-1
	• N - Acétyl • β - Glucosaminidase	1 - Naphthyl - N - Acétyl - βD - Glucosaminide	+ +	EC 3-2-1-29
	- α - L - Arabinosidase	PNP α L - Arabinofuranoside	+	
	- PNP - βD • Galacturono - Hydrolase	PNP - βD - Galacturonide	traces	
PROTEASES	- Leucine arylamidase	L - Leucyl - 2 - Naphthylamide	+ + + + +	
	- Valine arylamidase	L - Valyl - 2 - Naphthylamide	± traces	
	- Cystine arylamidase	L - Cystyl - 2 - Naphthylamide	+	
	- L - Phénylalanine arylamidase	L - Phényl - Alanyl - β - Naphthylamide	+ + +	
	- L - Lysine arylamidase	L - Lysyl - β - Naphthylamide	+ +	
	- L - Histidine arylamidase	L - Histidyl - β - Naphthylamide	+ + +	
	- Arginine arylamidase	L - Arginyl - β - Naphthylamide	+ +	
	- L - Alanine arylamidase	L - Alanyl - β - Naphthylamide	+ + +	
	- S - Benzyl - Cystéine arylamidase	S - Benzyl - L - Cysteyl - β Naphthylamide	+	
	- Méthionine arylamidase	DL - Méthionyl - β - Naphthylamide	+ +	
	- Glycyl - Phénylalanine arylamidase	Glycyl - L - Phénylalananyl β - Naphthylamide	+	
	- Glycyl - Proline arylamidase	Glycyl - L - Prolyl - β - Naphthylamide	+	

	ENZYMES DÉTECTÉES	SUBSTRAT	REPOSE	
	- L - Sérÿl - Tyrosine arylamidase	L - Sérÿl - L - Tyrosÿl - β - Naphthylamide	+	
	- L - Glutamine arylamidase	L - Glutamÿl - β - Naphthylamide, HCl	+++	
	<i>a</i> - L - Glutamate Aylamidase	<i>a</i> - L - Glutamÿl - β - Naphthylamide	+++	
	- L - Isoleucine arylamidase	L - Isoleucÿl - β - Naphthylamide	+++	
	- L - Ornithine arylamidase	L - Ornithÿl - β - Naphthylamide	+++	
	- L - Sérÿne - Arylamidase	L - Sérÿl - β - Naphthylamide	+++	
	- L - Thréonine arylamidase	L - Thréonÿl - β - Naphthylamide	+++	
	- L - Tryptophane arylamidase	L - Tryptophane - β - Naphthylamide	++	
	- L - Alanyl - L - Arginine arylamidase	L - Alanyl - L - Argÿnÿl - L - Naphthylamide	++	
	- L - Alanyl - L - Phénylalanÿl L - Proline Arylamidase	L - Alanyl - L - Phénylalanÿl - L - Proline - β - Naphthvamide	++	
	- L - Aspartÿl - L - Arginine arylamidase	L - Aspartÿl - L - Arginine β Naphthylamide	+	
	- <i>a</i> -L-Grylamÿl- <i>a</i> - L - Glutamic arylamidase	<i>a</i> - L - Glytamÿl - L - Glutamic β - Naphthylamide	+	
	- <i>a</i> - L - Glutamÿl - L - Histidine arylamidase	<i>a</i> - L • Glutamÿl - L - Histidine β - Naphthylamide	++	
	- Glycÿl - L - Alanine arylamidase	Glycÿl - L - Alanine - β - Naphthylamide	++	
	- L - Leucÿl - L - Valÿl L -Tyrosÿl - L - Serine arylamidase	L - Leucÿl - L - Valÿl - L -Tyrosÿl L - Serine - β - Naphthylamide	++	
	-L-Phénylalanÿl -L-Proline arylamidase	L - Phénylalanÿl - L - Proline β - Naphthylamide	++	
	- L-Phénylalanÿl-L-proÿl L - Alanine arylamidase	L - Phénylalanÿl - L - Proline β - Naphthylamide	+	
	- L-Sérÿl-L-Méthionine arylamidase	L - Sérÿl - L - Méthionine β - Naphthvamide	++	
	- N-Acétÿl-Glycÿl - L - Lysine arylamidase	N - Acétÿl - Glycÿl - L - Lysine β - Naphthvamide	+	
	- L - Histidine L - phénylalanine arylamidase	L - Histidine - L - Phénylalanine β - Naphthylamide	++	

nuit pour les coupes : aucun résultat négatif n'a été rendu positif dans ces conditions. Une autre justification de la différence entre les deux séries d'essais réside dans les conséquences du prélèvement : lors de la pression sur la glande pour obtenir du venin, les constituants sont pris au hasard ; ils proviennent des grandes cellules, éventuellement des granules, des liquides sécrétés le long du tissu de soutien, etc. De plus, les organites intracellulaires présents dans le tissu en place peuvent être altérés et leur substance agir sur d'autres constituants. L'utilisation du système API nous semble fiable, pour l'analyse enzymatique du venin de la petite Vive, *Thachinus vipera* : plus sensible que l'histoenzymologie, il est également beaucoup plus rapide, et extrêmement simple à mettre en œuvre.

La comparaison est effectuée dans le Tableau V.

Tableau V : Comparaison des activités enzymatiques détectées par la méthode API et par histoenzymologie.

	API	HISTOENZYMOLOGIE
Phosphatase acide	40 nM	+ + +
Phosphatase alcaline	5 nM	+ (granules)
Phosphoamidase	20 nM	+ (conjonctif)
Lipase	5 nM (C14)	-
B - Glucuronidase	10 nM	+ + (granules)
Trypsine	-	-
a Chymotrypsine	-	-
Aminopeptidases	de 5 à 30 nM	non recherchées, mais dénaturation <b>rapide des protéines</b>

Comparaison avec les activités enzymatiques détectées dans d'autres venins de Poissons.

La détection des activités enzymatiques dans les venins d'autres Poissons a été faite par des méthodes qui n'ont, le plus souvent, pas été précisées. Dans tous les cas signalés, il s'agit en fait de recherches sur le venin lui-même. Peu de travaux ont d'ailleurs été effectués. Ils sont résumés dans le tableau VI, auquel nous adjoindrons, pour comparaison, les résultats obtenus, chez *Thachinus vipera*, pour les enzymes citées.

Ces données ne permettent pas, du fait du petit nombre de recherches effectuées, du manque d'information sur les techniques et de l'évolution des méthodes de détection, d'établir une comparaison valable des activités enzymatiques mises en évidence dans les venins des quatre espèces examinées.

TABLEAU VI : Activités enzymatiques détectées dans les venins de Poissons :  
(1) Austin *et al.*, 1961 ; (2) Cameron *et al.*, 1981 ; (3) Haavaldsen et Fonnum, 1963 ; (4) Briot, 1904.

	Synanceja trachynis Synanceja verrucosa	Trachinus draco	Trachinus vipera
Protéases	- (1) faible (2)	+ avec kinase (4)	aryl - amidases
Phospholipase a	- (1)		
Acetyl - cholinesterase	- (1)	+ (3)	-
Butyryl - cholinesterase		+ (3)	-
Pseudocholinesterase	- (1)		-
Adenine triphosphatase	- (1)		+
Hyaluronidase	+ (1)		-
Lecithinase	pas d'enzyme hémolytique (1)	- (3)	
Phosphodiesterase		- (3)	

## CONCLUSION GÉNÉRALE : HYPOTHÈSE SUR LA CONSTITUTION DU VENIN

Une pression exercée sur les cellules glandulaires (prélèvement de venin avant fixation des glandes, dissection...) libère un liquide qui s'écoule à l'extrémité de l'épine. L'observation de ces "glandes" vidées montre que l'on retrouve des cellules de type IV fragmentées, possédant peu de cytoplasme et sans vacuole contenant le produit de sécrétion. Par contre, le tissu de soutien persiste, ainsi que de nombreux granules. Pour nous, le venin serait donc constitué essentiellement du cytoplasme des grandes cellules, du produit de sécrétion accumulé dans les vacuoles, et accessoirement, des granules. Cette hypothèse diffère de celle formulée par Skeie (1962) pour *Trachinus draco* ; pour lui, les granules constitueraient la fraction vénéreuse. Mais cet auteur n'a pas observé de produit de sécrétion, d'une part, ni le tissu de soutien : selon son interprétation, les cellules de la "glande vénéreuse" ne devraient pas être considérées comme des cellules sécrétrices, puisque la substance "sécrétée" (c'est-à-dire, le venin), proviendrait d'une dégénérescence cellulaire. Si l'on admet, conformément à nos observations, que le venin correspond essentiellement au cytoplasme des grandes cellules (types IV et V avant dégénérescence complète), il serait de nature protéique. Parmi les acides aminés que nous avons pu détecter par les méthodes histochimiques, la cystéine et d'autres substances réductrices, la cystine, le tryptophane et la tyrosine sont des éléments importants. Une autre remarque s'impose : les lysosomes sont particulièrement abondants dans le cytoplasme des cellules de type IV ; or, il est connu, ainsi que le rappelle Straus (1967), que de nombreuses enzymes sont contenues dans des lysosomes. La grande variété des lysosomes observés dans les cellules de type IV, et dont certains peuvent être assimilés à des corps multivésiculaires, des corps denses ou des corps résiduels, pourrait indiquer un phénomène de dégradation intracellulaire, en accord avec notre hypothèse de l'évolution des cellules glandulaires de *Trachinus vipera* (Perrière, 1985 ; Perrière & Michel, 1986).

Enfin, un autre argument peut être opposé à l'hypothèse de Skeie quant à la constitution du venin par les granules. En effet, ils apparaissent au sein de grandes cellules de type IV, et l'envahissent peu à peu, probablement, par un phénomène de dégénérescence intracellulaire. De telles structures ont déjà été observées : Pawlowsky (1911) signale la présence de "pigment-like degenerated-cells" chez divers Scorpaenidae, tandis que Tange (1954) en nie l'existence dans toutes les glandes des Poissons qu'il a examinées. Cameron et Endean (1966, 1971) ont remarqué chez *Nothestes robusta* des sphères et des sécrétions granulaires qui évoquent l'aspect des granules de *Trachinus*. Comme par ailleurs, nous n'avons pas pu les mettre en évidence dans la totalité des glandes examinées, il est permis de penser que ces granules correspondent à un stade d'un phénomène évolutif de la cellule glandulaire, ou, conformément à ce que suggèrent nos travaux ou ceux de Pawlowsky (1911) et de Skeie (1962), à un stade avancé dans la dégénérescence. Si



l'on admet que les granules correspondent à une dégénérescence de la cellule sécrétrice, et si l'on considère en outre que, dans le cas de *Thachinus*, la "glande venimeuse" qui a subi une pression doit pouvoir régénérer, il convient de rechercher dans le tissu de soutien les jeunes cellules sécrétrices. C'est ce que proposent Cameron et Endean (1966, 1972), hypothèse confirmée par notre observation morphologique (Perrière, 1985 ; Perrière & Michel, 1986).

Ces données histochimiques ont apporté d'utiles renseignements sur la composition chimique du venin, et ont permis de détecter *in situ* un certain nombre d'enzymes. Les méthodes histoenzymologiques et l'utilisation des galeries de détection des activités enzymatiques ont apporté des informations complémentaires. Il reste à étudier le venin de la petite Vive par des techniques biochimiques.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions le Professeur P. Binet pour l'accueil qu'il nous a réservé et les facilités qu'il nous a données. F. Goudey-Perrière pour sa collaboration constante. P. Brousse-Gaury pour l'aide apportée. J. Charpentier, J. Degerit et C. Donnet ont assuré l'entretien des animaux.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALBANESE CARMIONANI, M.P. & G. ZACCONE, 1975. Histochemical analysis of epidermal cells and mucous cells in the skin of *Torpedo ocellata* Rafinesque. *Acta histochem*, 52, 100-110.
- AUSTIN, L., K.D. CAIRNCROSS, & I.A.N. MC COLLUM, 1961. Some pharmacological actions of the venom of the stonefish *Synanceja horrida*. *Arch. Int. Pharmacodyn*, 131, 339-347.
- BARAKA, T., 1960. A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature*, 187, 248-249.
- BARNETT, R.J. & A.M. SELIGMAN, 1952. Histochemical demonstration of protein-bound sulphhydryl groups. *Science*, N.Y., 16, 323-327.
- BARNETT, R.J. & A.M. SEUOMAN, 1954. Histochemical demonstration of sulphhydryl and disulfide groups of protein. *J. Nat. Cancer Inst.*, 14, 769-792.
- BARNETT, R.J. & A.M. SEUOMAN, 1958. Histochemical Demonstration of Protein-Bound Alpha-Acylamido Carboxyl groups. *J. Biophysic and Biochem. Cytol*, 4, 169-176.
- BENNETT, H.S. 1951. The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulphhydryl reagent. *Anat. Record.*, 110, 231-246.
- BIANCHI, S., 1975. Preliminary observations on the epidermis of *Uegitglanis zammaranoi* Gianferrari (Clariidae, Siluriformes). *Monitore zool. ital.*, (NS) Suppl., VI, (5) 91-101.
- BOQUET P., 1957. Poisons animaux. Intoxications par les venins de serpents, d'insectes et d'arachnides. *Intoxications*, 6, 16078 A 10: 1-10.
- BOQUET P., 1970. Venins de serpents. In "Traité de Zoologie", XIV, 2, 599-680, Masson éd., Paris.
- BOQUET P., Y. IZARD, M. JOUANNET, & J. MEAUME, 1966. Étude de deux antigènes toxiques du venin de *Naja nigricollis*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 262 : 1134-1137.
- BOQUET P., Y. IZARD & A.M. RONSSERAY, 1970. Essai de classification des protéines toxiques extraites des venins de serpents. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 271: 1456-1459.

- BRIOT A., 1904. Sur l'existence d'une kinase dans le venin de la Vive, (*Trachinus draco*). *C.R. Soc. Biol.*, 56:1113-1114.
- BULLOCK, A.M., R.J. ROBERTS, & J.D.M GORDON, 1976. A study on the structure of the whiting integument (*Merlangius merlangus* L.). *J. mar. biol. Ass. U.K.* 56: 213-226.
- BULMER, D., 1959. Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.* 34: 95-98.
- BURSTONE, M.S., 1959. New histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxydase. *J. Histochem. Cytochem.*, 7:112-122.
- CAMERON, A.M. & R. ENDEAN, 1966. The venom apparatus of the scorpion fish *Notesthes robusta*. *Toxicon*, 4:111-121.
- CAMERON, A.M. & R. ENDEAN, 1971. The axillary glands of the Plotosid catfish, *Cnidoglanis macrocephalus*. *Toxicon*, 9: 345-352.
- CAMERON, A.M. & R. ENDEAN, 1972. The venom glands of Teleost fishes. *Toxicon*, 10: 301-303.
- CAMERON, A.M., J. SURRIDGE, W. STABUM & R.J. LEWIS, 1981. A crinotoxin from the skin tubercle glands of a stonofish (*Synanceja trachynis*). *Toxicon*, 19 :159-170.
- CARLISLE, D.B., 1962. On the venom of the lesser weeverfish, *Trachinus vipera*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 42 : 155-162.
- CHICQUOINE, A.D., 1953. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and in the kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 1: 429-435.
- CUNNINGHAM, L., 1967. Histochemical observations of the enzymatic hydrolysis of gelatin films *J. Histochem. Cytochem.*, 15: 292-298.
- DANIELLI, J.F., 1947. A study of techniques for the cytochemical demonstration of nucleic acids and some components of proteins. *Symp. Soc. exp. Biol.*, 1:101-113.
- DE LA TORRE, J.C. 1980. An improved approach to histofluorescence using the SPG method for tissue monoamines. *Journal of neuroscience methods*, 3:1-5.
- DE LA TORRE, J.C. & J.W. SURGEON, 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxilic acid technique : The SPG method. *Histochemistry*, 49:81-83.
- FISHER, E.R. & R.D. LILLIE, 1954. The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.*, 2 : 81-87.
- GANTER, P. & G. JOLLES, 1970. *Histochimie normale et pathologique*. Gauthiers-Villars, Paris, 1904 pp.
- GEREBTZOFF, M.A. 1953. Recherches histochimiques sur les acétylcholines et les cholinestérases. I. Introduction et technique. *Acta anata*, 19: 366-379.
- GIBBS, H. D., 1927. Phenol tests III. The indophenol test. *J. Biol. Chem.*, 72: 649-664.
- GLENNER, G.G., 1957. The histochemical demonstration of indole derivative by the rosindole reaction of E. Fischer. *J. Histochem. Cytochem.*, 5 : 297-304.
- GOMORI, G., 1939. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. soc. exptl. Biol. Med.*, 42: 23-26.
- GOMORI, G., 1942. Distribution of acid phosphatase in the tissue under normal and pathological conditions. *Arch. Pathol.* 32 :189-199.
- GOMORI, G., 1945. The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Proc. soc. exptl. Biol. Med.*, 58: 362-364.
- GOMORI, G., 1946. Distribution of lipase in the tissues under normal and under pathological conditions. *Arch. Path.*, 41:121-129.
- GOMORI, 1948 a. Chemical character of the enterochromaffin cells. *Arch. Path.*, 45 : 48-55.
- GOMORI, G., 1948 b. Histochemical demonstration of sites of phosphoamidase activity. *Proc. soc. exptl. Biol. Med.*, 69 : 407-409.
- HAAVALDSEN, R., & F. FONNUM, 1963. Weever venom. *Nature*, 199, n° 4890, 1: 286-287.
- HABERMANN, E., 1968. Chimie, pharmacologie et toxicologie du venin. In *Traité de biologie de l'Abeille, 3-Les produits de la ruche*, R. Chauvin, Masson éd., Paris, 1: 363-389.
- HALSTEAD, B.W., 1970. *Poisonous and venomous Marine Animal of the World*. Vol. 3, *Vertebrates, Osteichthyes*. United State government Printing office, Washington, 1006 pp.
- HIMES, M. & L. MORIBER, 1956. A triple stain for deoxyribonucleic acid, polysaccharides and proteins. *Stain Technol.*, 31: 67-70.
- HOTCHKISS, R.D., 1948. A Microchemical Reaction Resulting in the Staining of Polysaccharide Structures in Fixed Tissue Preparations. *Arch. Biochem.*, 16:131-141.
- IZUMIKAWA, E., 1960. Étude histochimique des cellules des glandes cutanées et des piquants des poissons venimeux. *Yokohama Med. Bull.*, 11: 501-513.

- IZUMIKAWA, E., 1960. Étude histochimique des cellules des glandes cutanées et des piquants des poissons venimeux. *Yokohama Med. Bull.*, 11: 501-513.
- KOELLE, G.B. & J.S. FRIEDENWELD. 1949. Histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. soc. exptl. Biol. Med.*, 70: 617-622.
- KRAMER, H. & G.M. WINDRUM, 1953. Metachromasia after treating tissue sections with sulphuric acid. *J. Clin. Path.*, 6: 239-240.
- KRAMER, H. & G.M. WINDRUM. 1954. Sulphation techniques in histochemistry with special reference to metachromasia. *J. Histochem. Cytochem.*, 2:196-208.
- LEV, R. & S.S. SPICER. 1964. Specific staining of sulphate groups with alcian-blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 309 pp.
- LEWIS, D.B., 1976. Studies of the biology of the lesser weever fish *Trachinus vipera* Cuvier. I- Adaptations to a benthic habit. *J. Fish Biol.*, 8:127-138.
- LEWIS, D.B., 1980. Studies of the biology of the lesser weever fish *Trachinus vipera* Cuvier. II- Distribution. *J. Fish Biol.*, 17 :127-133.
- LILLIE R.D., 1954. *Histopathology Technic and Practical Histochemistry*. Blakiston Div. (Mc Graw Hill), New York, Toronto, London.
- LILLIE, R.D., 1957. Adaptation of the Morel-Sisley protein diazotisation procedure to the histochemical demonstration of protein bound tyrosine. *J. Histochem. Cytochem.*, 5 : 528-532.
- LISON, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Gauthier Villars, éd., Paris, 2 vol., 837 pp.
- MAC MANUS, J.F.A., 1946. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. *Nature*, 158: 202 pp.
- MAC MANUS J.F.A., & J.E. CASON, 1950. Carbohydrate Histochemistry studied by Acetylation Techniques. I. Periodic Acid Methods. *J. Nat. Cancer Inst.*, 10:1343-1344.
- Mc COMBS, H.L., & H.J. WHITE, 1968. Histochemistry of Hyaluronidase. Tissue localization of hyaluronidase in the testis by a new substrate Film Technic. *American J. Clin. Path.*, 49 : 68-74.
- MARK, D.D., 1950. Distribution of lipase in preneoplastic and neoplastic states induced in the rat liver by P-dimethylaminoazobenzène. *Arch. Path.*, 49 : 545-554.
- MASSON, P., 1914. La glande endocrine de l'intestin chez l'Homme. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 158: 59-61.
- MICHEL, C. & M. CHRETIEN, 1977. Modification of Cunningham's method for the detection of proteases in tissue sections. *Microscopica Acta*, 79:145-152.
- MICHEL, C, D. DAMAS & M. RUSAOUËN, 1983. Utilization of the histochemical techniques for the detection of various radicals of proteins and of 5-hydroxytryptamine in semi-thin sections. *Microscopica Acta*, 87:1-13.
- MICHEL, C. & B. KEIL, 1975. Biologically active proteins in the venomous glands of the Polychaetous Annelid, *Glycera convoluta* Keferstein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50 B, 29-33.
- MICHEL, G, J.C. MIRA & D. MITROVIC 1973. Une double coloration rapide pour coupes semi fines désaraldités. *Sonderuck aus des Medizinische laboratorium*, 26: 9-13.
- MILLON, E., 1849. Sur un réactif propre aux composés protéiques. *C.R. Acad. Sci.*, 28: 40-42.
- MITTAL, A.K., M. WHITEAR & S.K. AOARWAL, 1980. Fine structure and histochemistry of the epidermis of the fish *Monopterusuchia*. *J. Zool, Lond.*, 191:107-125.
- MOREL, A. & P. SISLEY, 1927. Les azoïques de la fibrome de la soie, leur constitution. *Bull. Soc. Chim.*, 41:1217-1224.
- MOWRY, R.W., 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucines. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue G8 X and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction. *Ann. N.Y Acad. Sci*, 106: 402-423.
- MOWRY, R.W. & C.H. WINKLER, 1956. The coloration of acid carbohydrat of Bacteria and Fungi in tissue sections, with special references to capsules of *Cryptococcus neoformens*, *Pneumococci* and *Staphylococci*. *Amer. I. Path.*, 36: 628-629.
- PAEGLE, R.D., 1965. Factors affecting enzymatic removal of glycogen from tissue sections and from entire rat liver blocks. *J. Histochem Cytochem*, 13 : 488-497.
- PAWLOWSKY, E., 1911. Ein Beitrag zur Kenntnis des Baues der Giftdrüsen einiger Scorpaeniden. *Zool Jahrb. Abt. F. Anat.*, 31: 529-542.
- PEARSE, A.G.E., 1953. The histochemical demonstration of cystine containing structures by methods involving alkaline hydrolysis. *J. Histochem. Cytochem.*, 1: 460-468.
- PERRIERE, C, 1980. Mise en élevage de la petite Vive, *Trachinus vipera* Cuvier et Valenciennes (Téléostéen, Perciforme, Trachinidae) en milieu artificiel. *Rev. fr. Aquariol*, 7: 53-60.

- PERRIERE, C., 1985. Les glandes venimeuses et le venin de la petite Vive, (*Trachinus vipera* C.V.) : étude cytologique et données biochimiques. *Doctorat de l'Université Paris VI, Cytologie*, 176 pp.
- PERRIERE C. & C. MICHEL, 1986. Les glandes operculaires de la petite Vive, *Trachinus vipera* C.V. (Perciforme, Trachinidae). I - Étude cytologique. Soumis pour publication aux *Cah. Biol. Mar.*
- RAVETTO, C., 1964. Associated alcian blue-alcian yellow: a new method for the identification of acidic groups. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 44-45.
- RUSSEL, F.E., 1963. Venomous animals and their toxins. *London Times Sci. Rev.*, 49:10-11.
- SCARPELLI, D.G., R. HESS & A.G.E. SELIGMAN, 1958. The cytochemical localization of oxidative enzymes. I- Diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 4: 747-760.
- SELIGMAN, A.M., K.E. Tsou, S.H. RUTENBURG & R.B. COHEN. 1954. Histochemical demonstration of  $\beta$ -glucuronidase with a synthetic substrate. *J. Histochem. Cytochem.*, 2: 209-219.
- SKEIE, E., 1962. The venom organs of the weeverfish *Trachinus draco*. *Med. Danmarks Fiskeri og Havundersgelser*, 3: 327-338.
- SPIKER, S.S., 1965. Diamines methods for differenciating mucosubstances histochemically. *J. Histochem. Cytochem.*, 13: 211-234.
- SPIKER, S.S. & M.H. JARRELS. 1961. Histochemical reaction of an aromatic diamine with acid groups and periodate engendered aldehydes in mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, 9 : 368-379,
- STRAUS, W., 1967. Lysosomes, phagosomes and related particles. In *Enzyme cytology*, D.B. Roodyn ed., Academic Press, London et New York, 1: 229-319.
- TANGE, Y., 1954. Beitrag zur Kenntnis der Morphologie des Gift-apparates bei den japanischen-Fischen, nebst bemerkungen über dessen Giftigkeit. IX. Über den Giftapparat bei *Sebastodes inermis* (Cuvier et Valenciennes). *Yokohama Med. Bull.*, 5 : 429-434.
- WEGMANN, R. & Z. BANKOWSKI 1960. Différenciation histochimique de quatre groupes d'adénosine triphosphatase, selon Slater. *Ann. Histochem.*, 5 :121-141.
- YASUMA, A. & T. ICHIKAWA. 1953. Ninhydrin-Schiff and Alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. *The Nagoya Journal of Medical Science*, 15 : 96-102.
- ZACCONE G., 1979. Mucosaccharide histochemistry and histoenzymorphologic observations on the epidermis of *Ariosomabalearicum* De la Roche (Anguilliformes, Pisces). *Acta histochem.*, 65 :191-208.