



Étude, par émission ionique secondaire, de l'accumulation du Rubidium dans les tissus mous de l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusque, Lamellibranche).

Marie-Lise SALAÜN et Michel TRUCHET

Équipe de Cytophysiologie analytique (CNRS, GDR 1117),
Université Pierre et Marie CURIE, - 12, rue Cuvier 75005 PARIS (France).
Télécopie : (33) 1 47 07 12 16.

Résumé : Lorsque les organismes marins sont confrontés à une pollution métallique, l'un des principaux problèmes qui se posent est de déterminer l'aptitude des membranes cellulaires, assurant l'interface avec le milieu extérieur, à reconnaître ces polluants et à les rejeter. Dans le cas des métaux alcalins, il est bien connu chez les Vertébrés que le rubidium est échangeable avec le potassium et jusqu'à un taux aussi élevé que un atome de rubidium pour deux atomes de potassium, sans qu'apparaissent de troubles. Nous nous sommes proposés de vérifier, dans cet article, s'il en allait de même chez un organisme marin et nous avons retenu un des mollusques les plus consommés par l'homme, l'huître *Crassostrea gigas*. Le rubidium a été ajouté dans l'eau de mer sous forme de chlorure ; les doses de 0,3 g.l⁻¹ (3,4 mM Rb⁺), 1 g.l⁻¹ (11,5 mM Rb⁺) et 3 g.l⁻¹ (34 mM Rb⁺) ont été mises à la place de NaCl. Un bac a reçu du potassium à la place du rubidium. Dans tous les cas, le traitement a été très mal supporté et l'examen histologique a révélé une sévère désorganisation des tissus. Chez tous les animaux traités au rubidium, la charge tissulaire est importante, comme le révèle l'émission ionique. Le métal est distribué dans tous les tissus, assez uniformément, mais quelques sites d'accumulation spécifique ont cependant été observés sur des polyanions. Nos résultats montrent clairement que, dans les conditions où nous l'avons administré, le rubidium est un métal toxique pour l'huître. Cette toxicité pourrait cependant relever du déséquilibre ionique de l'eau de mer puisque la substitution de Na par K provoque également des troubles importants. Des expériences ultérieures devront préciser ce point. Les quelques sites de bioaccumulation spécifique que nous avons observés nous amènent à conclure que, s'il franchit aisément les barrières membranaires, sans doute par les mêmes voies que le potassium, le rubidium n'est pas exactement mimétique de celui-ci.

Abstract: Sims investigation of Rubidium accumulation in the soft tissues of the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusc, Bivalve). When marine organisms are exposed to pollutant metals, one of the main issues to be investigate is how these metals can be recognized by the membrane transporters. The first elements of the periodic table are the alkali metals and it is well documented in vertebrates that rubidium is exchanged at a high rate with potassium, without toxicity. Our purpose was to study the effect of Rb in the human food organism, *Crassostrea gigas*. Rubidium was added to the artificial sea water as chloride salts to replace some of the sodium ions at the concentrations of 0.3 g.l⁻¹ (3.4 mM Rb⁺), 1 g.l⁻¹ (11.5 mM Rb⁺) and 3 g.l⁻¹ (34 mM Rb⁺). Some animals were exposed to water with K instead of Rb ions. All these modifications were toxic for the animals and histological observations reveal high tissue disorganization. The rubidium is strongly present in all tissues, as revealed by SIMS analysis. Rubidium is widely and somewhat uniformly distributed, but some Rb accumulated in specific areas identified as polyanionic sites. Our results reveal clearly that rubidium is toxic for oysters, but this toxicity may be due mainly to the ionic modification, i.e. the replacement of Na by Rb because the same is observed when Na is replaced by K. As in Vertebrates, Rb crosses easily the membrane barrier, likely by the channels and K-pumps. But some specific bioaccumulations led us to conclude that Rb metabolism is not exactly similar to that of K.

Keywords : Rubidium - Oyster - SIMS - Metal toxicology.

Introduction

Reçu le 1^{er} avril 1996 ; accepté après révision le 21 mars 1997.

Received 1 April 1996 ; accepted in revised form 21 March 1997.

La vie met en jeu, outre les principaux constituants de la matière organique (H, C, N, O), une vingtaine d'éléments

qui sont, pour la plupart, des métaux (*in Javilliers, M. et al.*, 1959).

Certains de ces métaux, tels que Mg, Ca, Fe, Cu, Zn ont une fonction physiologique parfaitement établie depuis longtemps, d'activateurs d'enzymes, de stabilisateurs d'acides nucléiques, de transporteurs d'oxygène ou de constituants de métalloprotéines.

D'autres, les métaux alcalins Na et K, participent au maintien de l'équilibre ionique entre les compartiments intra- et extracellulaires et à l'activité électrique membranaire.

Par contre, quelques éléments comme Al ou Cr jouent des rôles encore mal définis.

Les raisons pour lesquelles de nombreux autres éléments ne sont pas utilisés par les organismes sont obscures. Lorsqu'ils se trouvent dans le milieu sous une forme chimique soluble, ils sont biodisponibles, c'est-à-dire assimilables. La question se pose de savoir si les transporteurs membranaires les reconnaissent ou si les similitudes de leurs propriétés chimiques avec celles d'éléments nécessaires à la vie conduisent à une certaine interchangeabilité. Ce problème est particulièrement important chez les organismes marins lorsqu'ils se trouvent confrontés à une pollution, notamment métallique, de leur milieu.

L'interchangeabilité des éléments a suscité d'innombrables travaux ; ils ont montré *in vitro* la possibilité de substitution d'une coenzyme métallique par d'autres métaux, avec des rendements déterminés. De même, dans le cas des métaux alcalins diffusibles, s'il semble que le sodium soit peu échangeable avec le lithium, il est en revanche bien établi maintenant que le potassium est fortement échangeable avec le rubidium, au point que beaucoup d'auteurs le considèrent comme un simple traceur du potassium. Des expériences réalisées *in vivo* sur de petits rongeurs (souris, rat, cobaye) montrent la possibilité de remplacement du potassium par du rubidium jusqu'à la proportion de un atome de rubidium pour deux atomes de potassium sans apparition de troubles (Alexander & Meltzer, 1975). Le cas du rubidium semble actuellement unique, à de telles proportions, mais il n'a été étudié que chez des mammifères (Truchet, 1984).

La question se pose donc de savoir si ce phénomène est particulier aux Vertébrés terrestres les plus évolués ou si, au contraire, il est général, comme le laisserait supposer le caractère universel du rôle joué par le potassium dans les processus vitaux.

Nous avons entrepris de le vérifier en tentant de surcharger en rubidium un organisme marin : l'huître *Crassostrea gigas* (Mollusques, Lamellibranches ou Bivalves). Outre leur intérêt alimentaire pour l'homme, les huîtres présentent l'avantage de supporter des gammes de salinité assez étendues, ce qui nous autorisait à modifier de manière importante le milieu marin dans lequel elles étaient placées.

Matériel et Méthodes

Protocole de contamination

Vingt-cinq huîtres *Crassostrea gigas* de même provenance et de même âge (taille approximative : 4 cm) sont réparties en cinq lots de cinq animaux.

L'expérience est réalisée pendant 28 jours à une température de 12 ± 2 °C avec oxygénation permanente de l'eau. Celle-ci est renouvelée tous les quatre jours. Les huîtres sont nourries d'algues lyophilisées tous les deux jours.

Le premier lot sert de témoin et séjourne dans l'eau de mer reconstituée par pesée de 33,3 grammes de sel (Wiegandt GMBH & Co, RFA) par litre d'eau du robinet.

Trois autres lots sont placés en eau de mer enrichie en rubidium par adjonction de RbCl à raison de 0,3, 1 et 3 g de rubidium par litre ; les quantités de sel marin pesées sont diminuées en proportion. Le milieu du cinquième lot est amené à 3 g.l⁻¹ de potassium par pesée de KCl.

L'expérience portant sur la tolérance au rubidium, le choix des quantités s'est porté sur des valeurs simples, en grammes par litre. Les masses atomiques des trois cations (Na, K et Rb) étant différentes (Na = 23 ; K = 39 et Rb = 85,5), le tableau 1 donne le détail des pesées et des teneurs correspondantes en molécules-gramme.

Un animal est prélevé au temps 0 dans le bac témoin, les quatre animaux restants y sont prélevés à 24 h, 7 j, 15 j et 21 j.

Dans les bacs expérimentaux, un animal est prélevé dans chaque bac à 24 h, 7 j, 15 j, 21 j et 28 j après le début de l'expérience.

Préparation et examen des échantillons

Les huîtres sont séparées de leur coquille puis égouttées sur du papier filtre et fixées entières par immersion dans le mélange de Carnoy. Celui-ci est renouvelé au bout de quelques instants, puis une seconde fois après quelques minutes ; la durée de la fixation est de 12 h. Après trois rinçages à l'alcool absolu et au toluène, les animaux sont inclus dans la paraffine et coupés à 5 µm.

Des coupes étaillées sur lame de verre et colorées au rouge solide nucléaire - picro indigo carmin permettent le repérage des organes suivants :

Glande digestive - tube digestif, cœur, rein, muscle, branchie, manteau et tissu conjonctif vésiculeux.

D'autres coupes étaillées sur lame de verre sont colorées au Bleu Alcian à pH 0,5 et 2,5 pour la mise en évidence des mucines acides.

D'autres coupes sont traitées à l'acide périodique - Schiff avec test à la salive pour l'évaluation des réserves glycogéniques.

D'autres enfin subissent la réaction au nitrate d'argent de Von Kossa pour la caractérisation des éléments minéraux (Martoja & Martoja, 1967).

Tableau 1. Détail des pesées effectuées pour reconstituer l'eau de mer normale et chargée en rubidium ou en potassium.**Table 1.** Masses of Na, K and Rb salts weighed for making artificial seawater and different concentrations in rubidium and potassium.

Animaux	sel marin			RbCl		KCl		Concentration molaire totale (mM) (baisse)
	pesée (g.l ⁻¹)	concentration molaire totale (mM)	différence de concentration (baisse) (mM)	pesée (g.l ⁻¹)	concentration molaire propre (mM)	pesée (g.l ⁻¹)	concentration molaire propre (mM)	
Témoins	33,3	569						
Traités Rb : 0,3 g.l ⁻¹	32,91	562,5	- 6,5	0,42	3,5			- 3
Traités Rb : 1 g.l ⁻¹	31,92	545,5	- 13,5	1,41	11,7			- 2
Traités Rb : 3 g.l ⁻¹	29,09	497,25	- 71,75	4,24	35			- 37
Traités K : 3 g.l ⁻¹	27,61	472	- 97			5,72	77	- 20

Microanalyse ionique

L'analyse par émission ionique secondaire est effectuée sur des coupes étalées sur support d'or (Lyon-Alemand-Louyot et Cie, Paris), sous bombardement d'oxygène dans l'appareil CAMECA SMI 300 du laboratoire, dans les conditions habituelles (Truchet, 1975, 1982).

Pour tous les organes précédemment cités, un cliché est pris aux masses positives 12 (C), 23 (Na), 39 (K), 40 (Ca) et 85 (Rb) sur des plages représentatives de la structure de l'organe ; des spectres sont enregistrés sur chacune de ces plages. Notre appareil n'étant pas équipé d'un déflecteur électrostatique, clichés et mesures sont faits en basse résolution en masse ($M/dM = 300$).

Les différentes intensités ioniques ne sont pas mesurées de la même manière : pour les clichés, la mesure est faite sur une plage centrale (mesure locale) alors que les spectres sont enregistrés après focalisation du champ imagé sur la cathode du convertisseur (mesure globale) ; pour le tableau 3, les mesures sont normalisées au carbone pour une approche semi-quantitative (Truchet, 1983). De ce fait, les intensités sont comparables entre elles pour les différents clichés, de même pour les différents spectres et dans le tableau 3, mais elles ne peuvent être comparées entre elles dans ces trois types de représentation.

Résultats

Mortalité

Aucune mortalité n'est observée chez les témoins.

Les animaux soumis à une surcharge potassique meurent en moins de huit jours.

Les animaux soumis à la même surcharge (3 g.l⁻¹) en rubidium survivent deux semaines.

Les animaux soumis à la dose de rubidium de 1 g.l⁻¹ vivent trois semaines.

Les animaux, qui reçoivent la dose de 0,3 g.l⁻¹ de rubidium comme les témoins, ne sont sujets à aucune mortalité jusqu'au prélèvement final à 28 jours.

Anatomo-pathologie (tableau 2)

Aucune anomalie n'est relevée chez les témoins, si ce n'est la réponse très discrète à l'acide-periodique-Schiff, qui traduit, après le test à la salive, la faible valeur des réserves glycogéniques.

Le cœur et le rein des animaux traités présentent des signes, parfois extrêmes, de désorganisation tissulaire. Dans la glande digestive, des lésions apparaissent dès la première semaine.

Dans les autres tissus, et notamment la branchie pourtant très exposée, les signes d'altérations sont plus légers et n'apparaissent qu'aux temps longs.

Au bout de trois semaines, même pour la faible dose de 0,3 g.l⁻¹ de rubidium, l'ensemble des tissus est dans un état d'altération qui indique une morbidité avancée.

Les réserves glycogéniques, faibles au départ, disparaissent rapidement du tissu interstitiel.

Chez les animaux soumis à une forte surcharge potassique, et qui n'ont vécu que peu de jours, on constate une turgescence anormale des tissus, en particulier de la branchie, avec une altération importante du cœur et du rein.

Tableau 2. Etat histopathologique. L'état des tissus est noté de **D+** (début de désorganisation) à **D⁴⁺** (désorganisation extrême) ; **N** : état normal ; **I** : présence d'inclusions ; **T** : turgescence. Le signe - signifie l'absence d'observation.

Table 2. Histopathology. **N** : normal; **I** : inclusions; **T** : swelling; **D+** (slight disorganisation) to **D⁴⁺** (complete disorganisation).

Durée	Dose	Cœur	Rein	Glande digestive	Tube digestif	Branchie	Muscle	Tissu conjonctif	Manteau
24 heures	Rb 0,3 g.l ⁻¹	N	D+	N	N	N	N	N	N
	1 g.l ⁻¹	N	D+	N	N	N	N	N	N
	3 g.l ⁻¹	D++	D++	N	N	N	N	N	N
	K 3 g.l ⁻¹	D+	D++	N	N	N	N	N	N
7 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹	-	D+	D+	D+	N	-	N	N
	1 g.l ⁻¹	D+	-	D+	N	I	N	N	N
	3 g.l ⁻¹	D+++	D+++	D++	N	N	N	N	N
	K 3 g.l ⁻¹	D+++	D+++	N	N	T	N	N	N
15 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹	D+++	D ⁴⁺	N	N	I	N	N	N
	1 g.l ⁻¹	D+++	D ⁴⁺	N	D+	I	N	N	N
	3 g.l ⁻¹	-	D ⁴⁺	-	D++	I/D+	D++	D++	N
21 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹	N	D ⁴⁺	D+++	D+	D+	D+	N	N
	1 g.l ⁻¹	D++	D+++	D ⁴⁺	D+++	I	D+	N	N
28 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹	N	D+++	D ⁴⁺	D ⁴⁺	D+	D+	D+	D+

La désorganisation correspond à des modifications tissulaires différentes selon l'organe considéré :

Glande digestive : **D+** : apparition de cellules détachées de l'épithélium dans la lumière ; **D+++** : nombreuses cellules détachées.

Paroi du tube digestif : **D+** : présence de cellules détachées dans le tube digestif ; **D+++** : obturation du tube digestif par une grande quantité de cellules détachées ; **D⁴⁺** : dégénérescence du tube digestif, les cellules ne reposent plus sur la lame basale.

Cœur : **D+** : les fibres musculaires se disjoignent localement ; **D++** : hypertrophie, lésions localisées ; **D+++** : hypertrophie, dégénérescence totale.

Rein : **D+** : hypertrophie, épaisseissement de l'épithélium avec présence de cellules détachées dans la lumière des tubules ; **D⁴⁺** : dégénérescence rénale avancée.

Branchie : **I** : présence d'inclusions de nature indéterminée, vraisemblablement dues à une infiltration d'amœbocytes ; **T** : turgescence ; **D+** : desquamation cellulaire avec pycnose nucléaire.

Muscle : **D+** : séparation des fibres musculaires ; **D+++** : lésions tissulaires profondes.

Tissu conjonctif vésiculeux : **N** : le tissu conjonctif, bien que normal en apparence, est vidé de ses réserves de glycogène ; **D+** : des cellules éparses, détachées de la matrice extracellulaire ; **D++** : cellules détachées plus nombreuses.

Manteau : **D+** : quelques cellules desquamées apparaissent.

Different aspects of disorganisation are observed, according to the tissue:

Digestive gland: **D+** : in the lumen some cells are detached from the gland epithelium; **D+++**: numerous cells are detached.

Digestive tract : **D+** : in the lumen, some cells are detached from the gut epithelium; **D+++**: the lumen is filled with numerous detached cells; **D⁴⁺** : degeneration of the epithelium : the cells do not rest on the basal lamina.

Heart: **D+** : some muscular fibers are separated from each other; **D++**: enlargement, local lesions; **D+++**: enlargement, degeneration.

Kidney: **D+** : thickening of the epithelium with detached cells in the tubular lumen; **D⁴⁺** : large degeneration.

Gill: **I**: unidentified inclusions present, likely due to an amoebocytes invasion; **T**: swelling; **D+**: extensive desquamation of cells with pyknotic nuclei.

Muscle: **D+**: disorganisation of the muscular fibers; **D+++**: important tissular lesions.

Vesicular connective tissue: **N**: the tissue is normal but no glycogenic reserves are observed; **D+**: some detached cells; **D++**: numerous detached cells.

Mantle: **D+**: some cellular desquamation observed.

Chez ceux qui ont reçu une surcharge en rubidium, les atteintes gagnent progressivement tous les organes, en fonction de la dose et de la durée ; ces atteintes se traduisent surtout par des détachements de cellules.

Analyse ionique

Mesures (tableau 3)

Les intensités à la masse 85⁺ sont très faibles le premier jour ; chez les animaux traités au rubidium, elles croissent

Tableau 3. Intensités d'émission ionique secondaire (en Ampères). Ces intensités ne peuvent être comparées avec celles des planches : elles ne sont pas mesurées dans les mêmes conditions. Les intensités sont normalisées à un courant de 10^{-16} A de carbone $^{12}\text{C}^+$.

Table 3. Ion emission intensities (in Ampères). Do not compare these intensities with the plates: they are not measured in the same conditions. Ion intensities are normalized to an intensity of 10^{-16} A for the carbon at mass $^{12}\text{C}^+$.

Durée	Dose	Cœur	Rein	Glande digestive	Paroi du tube digestif	Branchie	Muscle	Tissu conjonctif vésiculeux et manteau
24 heures	K 3 g.l ⁻¹	< 10 ⁻¹⁷	< 10 ⁻¹⁷	-	< 10 ⁻¹⁷	< 10 ⁻¹⁷	< 10 ⁻¹⁷	< 10 ⁻¹⁷
7 jours	K 3 g.l ⁻¹	-	< 10 ⁻¹⁷	-	< 10 ⁻¹⁷			-
24 heures	Rb 0,3 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹ 3 g.l ⁻¹	1,5.10 ⁻¹⁷ - 3 .10 ⁻¹⁷	3,5.10 ⁻¹⁷ 10 ⁻¹⁷ 3,5.10 ⁻¹⁷	4 .10 ⁻¹⁷ 2 .10 ⁻¹⁶ 7,5.10 ⁻¹⁷	3.10 ⁻¹⁷ 4.10 ⁻¹⁷ 5.10 ⁻¹⁷	4 .10 ⁻¹⁷ 10 ⁻¹⁷ 2 .10 ⁻¹⁶	10 ⁻¹⁷ 2,5.10 ⁻¹⁸ 1,5.10 ⁻¹⁷	4 .10 ⁻¹⁷ - 3,5.10 ⁻¹⁶
7 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹ 3 g.l ⁻¹	9,5.10 ⁻¹⁷ 10 ⁻¹⁶ 3 .10 ⁻¹⁶	3,5.10 ⁻¹⁶ - 10 ⁻¹⁵	3 .10 ⁻¹⁶ 3 .10 ⁻¹⁶ 6,5.10 ⁻¹⁶	7.10 ⁻¹⁷ 2.10 ⁻¹⁶ -	2,5.10 ⁻¹⁶ 4 .10 ⁻¹⁶ 1,5.10 ⁻¹⁶	- 6,5.10 ⁻¹⁷ 2,5.10 ⁻¹⁶	10 ⁻¹⁶ 2 .10 ⁻¹⁶ 3 .10 ⁻¹⁵
15 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹	3,5.10 ⁻¹⁶ 8 .10 ⁻¹⁷	10 ⁻¹⁶ 6 .10 ⁻¹⁶	3 .10 ⁻¹⁷ 2,5.10 ⁻¹⁶	1,5.10 ⁻¹⁷ 1,5.10 ⁻¹⁶	8 .10 ⁻¹⁷ 5 .10 ⁻¹⁷	2,5.10 ⁻¹⁷ 4,5.10 ⁻¹⁶	5 .10 ⁻¹⁷ 2 .10 ⁻¹⁶
21 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹ 1 g.l ⁻¹	2 .10 ⁻¹⁶ 5,5.10 ⁻¹⁶	10 ⁻¹⁶ 3 .10 ⁻¹⁶	1,5.10 ⁻¹⁶ 6 .10 ⁻¹⁷	8.10 ⁻¹⁷ 3,5.10 ⁻¹⁶	2 .10 ⁻¹⁶ 3 .10 ⁻¹⁷	10 ⁻¹⁷ 7 .10 ⁻¹⁷	3,5.10 ⁻¹⁶ 2,5.10 ⁻¹⁶
28 jours	Rb 0,3 g.l ⁻¹	1,5.10 ⁻¹⁶	2 .10 ⁻¹⁵	4 .10 ⁻¹⁷	7,5.10 ⁻¹⁷	6,5.10 ⁻¹⁷	10 ⁻¹⁵	1,5.10 ⁻¹⁶

rapidement ; la plupart atteignent un maximum au bout de deux semaines et décroissent ensuite légèrement.

Images (figures 1 à 24)

Chez les témoins, en raison des intensités d'émission très faibles, les clichés à la masse 85^+ (Rb) ne délivrent que des images trop pâles pour être reproduites, sauf dans la glande digestive.

Dès 24 h, et pour la dose de 0,3 g.l⁻¹ de rubidium, les images, dont le contraste s'accroît avec la dose et la durée, montrent le métal distribué uniformément dans les tissus, à l'exception de la glande digestive.

Dans le cas particulier de la glande digestive, deux des témoins (24 h et 15 j) montrent des points de concentration de l'émission dans les cellules des diverticules. Des concentrations analogues apparaissent chez certains des animaux traités : 24 h, 0,3 g.l⁻¹ et 1 g.l⁻¹ : Figs 5, 6 ; 7 j, 3 g.l⁻¹ ; 15 j, 1 g.l⁻¹ ; 21 j, 0,3 g.l⁻¹ et 1 g.l⁻¹ ; 28 j, 0,3 g.l⁻¹ : Figs 17, 18, tandis que chez les autres, la distribution du rubidium est sans contraste marqué (Figs. 21, 22), comme pour les autres tissus.

Les zones de concentration des clichés ioniques correspondent à celles qui répondent positivement au Bleu Alcian pratiqué sur coupes voisines, mais négativement à la réaction de Von Kossa.

Seules les images ioniques sont présentées en planches. Le nombre de clichés étant très élevé, seul un échantillonnage est fourni aux masses 85, 12, 23, 39 et 40.

Spectres (figures 25 à 28)

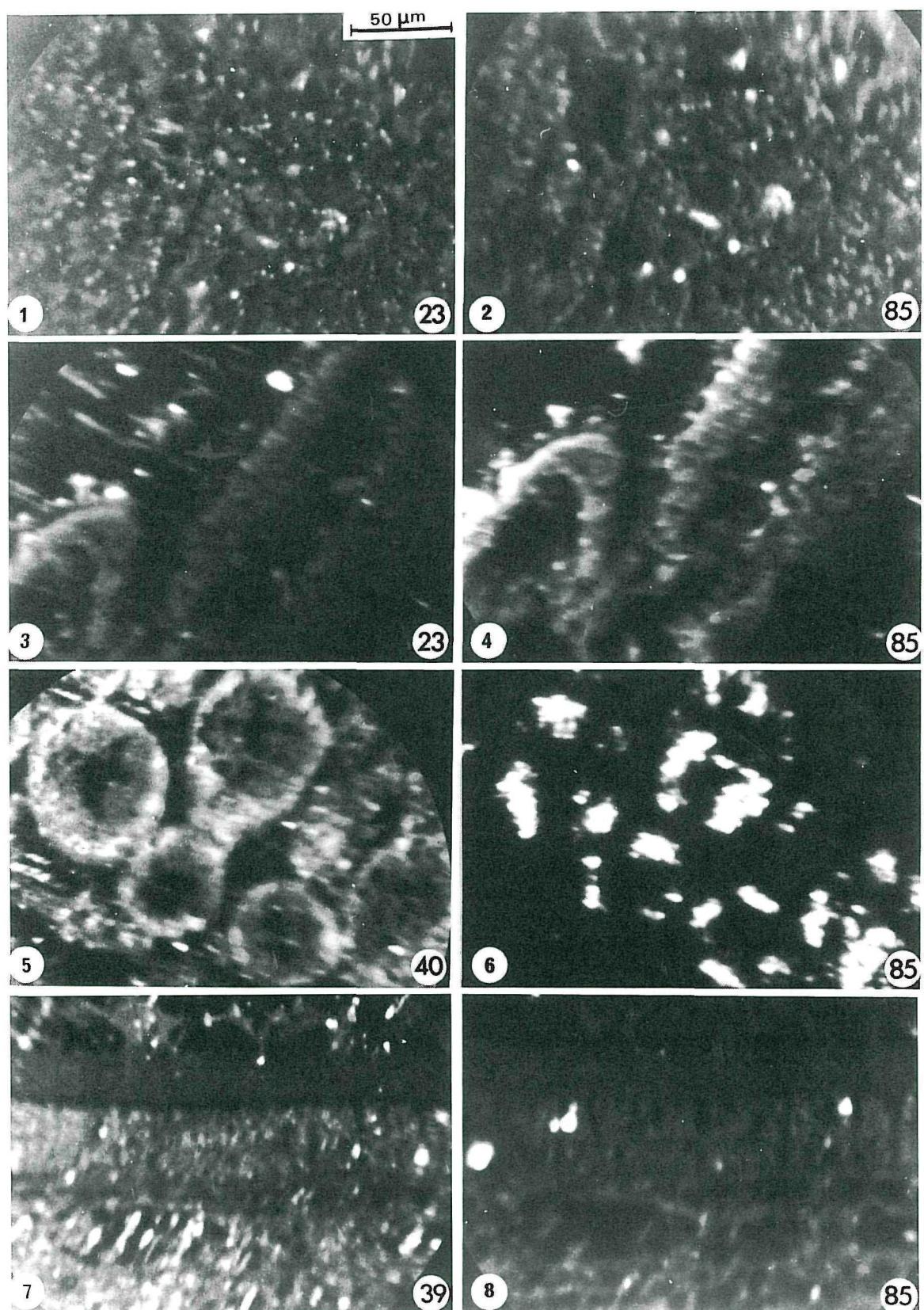
Les intensités aux masses 85^+ et 87^+ ne se démarquent pas du bruit de fond chez les témoins ; seule, la haute résolution en masse permettrait d'identifier le métal.

Chez les animaux traités au rubidium, ces masses se démarquent du bruit de fond dès 24 h, et deviennent assez intenses à partir de 7 jours, quels que soient le tissu ou la dose de rubidium administré, pour que l'identification du rubidium ne soulève aucune difficulté.

Discussion

En analyse ionique, sur spectres, le rubidium est situé à la fin de la zone des interférences majeures (Truchet, 1975) mais le fond d'ions polyatomiques y est encore important. Seule, la spectrométrie en haute résolution en masse permet de séparer, à la masse 85^+ , les ions rubidium des ions polyatomiques interférents (Truchet, 1980, 1982, 1984).

Chez les témoins, nous ne pouvons donc pas affirmer la présence de rubidium. Cependant, il est admis que, dans tous les tissus vivants, il existe une faible quantité de rubidium dont le rôle physiologique et même la forme chimique sont mal connus (*in* Javillier *et al.*, 1959 ; Lombeck *et al.*, 1980). Par ailleurs, les spectres enregistrés en haute résolution à la masse 85^+ sur d'autres échantillons ont toujours montré une contribution du rubidium (Truchet, 1982, 1984). Il est donc probable que le faible signal à la masse 85^+



indique la présence de traces de rubidium chez les témoins ; ce point mériterait cependant d'être repris dans un travail ultérieur.

Chez les animaux traités, les intensités d'émission à la masse 85^+ sont suffisamment élevées, même aux temps les plus courts et pour la plus faible dose, pour que la haute résolution en masse ne se révèle pas nécessaire. De ce point de vue, les tissus de l'huître fournissent le même type de résultats que ceux obtenus chez la souris (Truchet, 1984).

Le rubidium est classiquement considéré comme un analogue du potassium, auquel il se substituerait (Bartschat & Blaustein, 1985) ; il se trouverait donc sous forme diffusible dans les tissus mous. Or, après fixation au Carnoy, l'importance des signaux rubidium suggère qu'une fraction importante est conservée ; le rubidium se trouverait donc dans les tissus, non pas sous forme ionique, libre et diffusible, mais dans une combinaison chimique résistant aux traitements histologiques qu'il conviendra de préciser dans des travaux ultérieurs. L'examen des images ioniques montre d'ailleurs, entre les clichés Rb et K, de légères mais nombreuses dissimilarités qui plaident en faveur de réelles différences physiologiques entre les deux alcalins.

Chez les animaux traités, l'augmentation de l'intensité d'émission du rubidium jusqu'à 15 jours est le signe d'une accumulation tissulaire au cours du temps. Cette accumulation est particulièrement nette à l'examen des spectres où le rubidium apparaît comme un élément majeur dès la première semaine.

L'examen anatomo-pathologique révèle, dès les premières 24 heures, une importante nécrose tissulaire au niveau du cœur et du rein ; cette nécrose gagne avec le temps les autres tissus et, vers la fin de l'expérience, le nombre de cellules mortes encore en place dans les tissus ou détachées, est très élevé. L'examen des réserves glycogéniques montre que celles-ci étaient faibles, dès le début de l'expérience, sans doute en relation avec le cycle génital ; il est possible que ce facteur ait contribué à fragiliser les animaux. Ceux-ci n'en ont pas moins subi un véritable empoisonnement et doivent se trouver rapidement en état d'insuffisance physiologique ; c'est probablement ce qui explique la tendance à la décroissance des intensités des signaux rubidium observée après 15 jours.

Dans tous les tissus, l'accumulation du rubidium est homogène, sauf dans les mucosités apicales du manteau et dans les inclusions à mucines des cellules de la glande digestive. Dans ce dernier cas, observé aussi chez certains témoins, la concentration de rubidium peut se produire en l'absence d'intoxication par le métal. Cette accumulation a lieu, non sous forme minérale mais en liaison avec les mucines acides dont la sécrétion est considérablement augmentée, ainsi qu'en témoignent les réactions de Von Kossa et les colorations au Bleu Alcian. Les fonctions acides, carboxyles et sulfates des mucines constituent, à l'évidence, les ligands du métal. Ce phénomène de concentration de rubidium par les cellules digestives d'animaux vivant dans un milieu n'ayant subi aucune surcharge en ce métal n'avait,

Figures 1 à 24. Clichés de microanalyse ionique. Les chiffres indiqués à droite dans chaque figure correspondent aux masses atomiques des isotopes majeurs des différents cations : Na = sodium, Rb = rubidium, Ca = calcium, K = potassium, C = carbone.

Figures 1 et 2. **Cœur** d'une huître placée dans une eau enrichie à 3 g.l^{-1} de rubidium (35 mM Rb^+) pendant 7 jours. Fig. 1 : 23^+ (Na) ($3,5 \times 10^{-16}$ Ampères ; 100 secondes). Fig. 2 : 85^+ (Rb) (6×10^{-17} A ; 10 minutes).

Noter l'émission du rubidium par l'ensemble du tissu cardiaque.

Figures 3 et 4. **Rein** d'une huître placée dans une eau enrichie à $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ de rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) pendant 15 jours. Fig. 3 : 23^+ (Na) (6×10^{-16} A ; 50 s). Fig. 4 : 85^+ (Rb) (4×10^{-17} A ; 15 mn).

Figures 5 et 6. **Glande digestive** d'une huître placée dans une eau enrichie à 1 g.l^{-1} de rubidium ($11,7 \text{ mM Rb}^+$) pendant 24 heures. Fig. 5 : 40^+ (Ca) ($4,5 \times 10^{-15}$ A ; 20 s). Fig. 6 : 85^+ (Rb) (3×10^{-17} A ; 20 mn).

Noter la concentration de l'émission du rubidium dans les cellules des diverticules digestifs. Cette bioaccumulation, qui ne se retrouve pas sur le cliché potassium (non montré), ne semble pas affecter avec la même intensité tous les diverticules de la glande digestive.

Figures 7 et 8. **Paroi du tube digestif** de la même huître que ci-dessus (1 g.l^{-1}) ($11,7 \text{ mM Rb}^+$) (24 h). Fig. 7 : 39^+ (K) (3×10^{-15} A ; 20 s). Fig. 8 : 85^+ (Rb) ($2,5 \times 10^{-17}$ A ; 20 mn).

Figures 1 to 24. Plates from the ionic microanalysis (SIMS images). Numbers on the right side on each figure correspond to atomic masses of the main isotopes of the different cations: Na = sodium, Rb = rubidium, Ca = calcium, K = potassium, C = carbon.

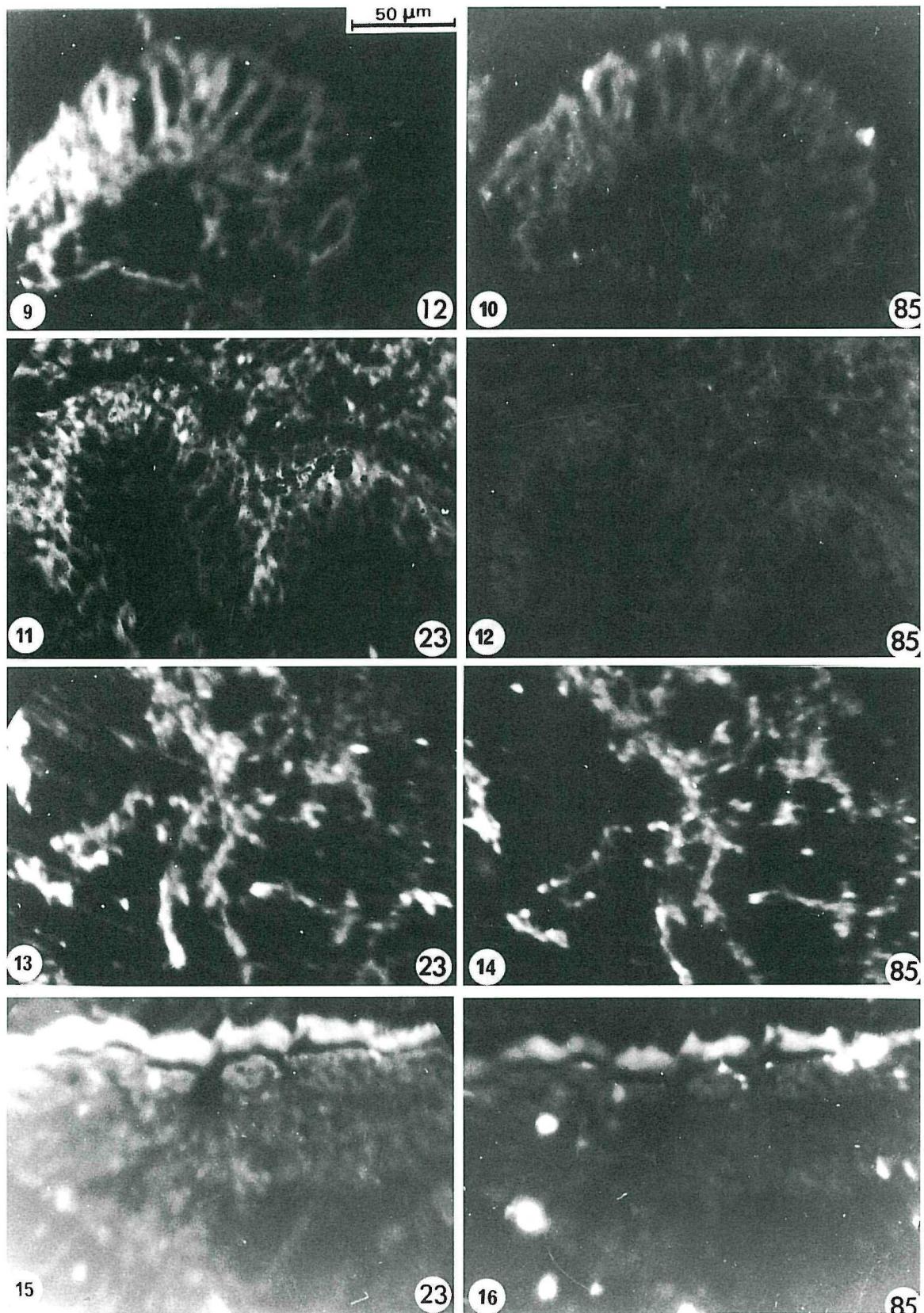
Figures 1 and 2. **Heart** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 3 g.l^{-1} of rubidium (35 mM Rb^+) for 7 days; Fig. 1 : 23^+ (Na) ($3,5 \times 10^{-16}$ Ampères; 100 seconds); Fig. 2 : 85^+ (Rb) (6×10^{-17} A; 10 minutes); *Rubidium is emitted by the whole tissue.*

Figures 3 and 4. **Kidney** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ of rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) for 15 days; Fig. 3 : 23^+ (Na) (6×10^{-16} A; 50 s); Fig. 4: 85^+ (Rb) (4×10^{-17} A; 15 mn).

Figures 5 and 6. **Digestive gland** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 1 g.l^{-1} of rubidium ($11,7 \text{ mM Rb}^+$) for 24 h; Fig. 5 : 40^+ (Ca) ($4,5 \times 10^{-15}$ A; 20 s); Fig. 6 : 85^+ (Rb) (3×10^{-17} A; 20 mn);

Rubidium emission is concentrated in some points of digestive cells. This bioaccumulation is not observed on the potassium image (not presented here) and not in all the digestive cells.

Figures 7 and 8 : **Wall of the digestive tract** of the same oyster used in fig. 5 and 6; Fig. 7 : 39^+ (K) (3×10^{-15} A; 20 s); Fig. 8 : 85^+ (Rb) ($2,5 \times 10^{-17}$ A; 20 mn).



semble-t-il, jamais été décrit auparavant. Il confirme l'hypothèse, précédemment évoquée, d'une présence naturelle de rubidium dans les tissus animaux.

En revanche, dans le cas des mucosités apicales du manteau, l'hypothèse d'une adsorption à partir du milieu extérieur ne peut être écartée.

Pour surcharger l'eau de mer reconstituée en rubidium ou potassium, nous avons choisi d'utiliser des doses de cations simples, pondérales, et nous avons diminué d'autant la quantité de sel de mer, pour maintenir la salinité totale de 33,3 g.l⁻¹ constante en masse. Le tableau 1 montre que l'inconvénient de ce procédé, compte tenu des masses atomiques différentes des trois alcalins, est d'entraîner une modification des concentrations relatives des différents cations et, notamment, d'altérer le rapport Na/K.

Nos résultats montrent que, si les huîtres sont aptes à supporter des variations de salinité globale importantes, elles supportent très mal ce déséquilibre Na/K. Il en va de même chez le lamellibranche dulçaquicole *Dressena* (Wilcox & Dietz, 1995).

Il est donc possible que la toxicité observée provienne davantage du déséquilibre ionique que d'un effet spécifique du rubidium. A dose pondérale égale de rubidium et de potassium, la toxicité est moins forte pour Rb que pour K : il s'agit là d'une importante différence entre les deux alcalins, même si l'on tient compte de leur différence de masse.

Inversement, les lésions tissulaires révélées à l'examen anatomo-pathologique sont les mêmes dans les cas du potassium et du rubidium ; de telles lésions sont induites également par d'autres formes d'intoxication (Ballan-

Dufrançais *et al.*, 1990 ; Delamarre & Truchet, 1984) et sont en fait atypiques. Seule la turgescence des tissus occasionnée par l'excès de potassium semble spécifique.

Il sera cependant souhaitable d'entreprendre de nouvelles expériences, dans le but de vérifier s'il existe un mode d'administration du rubidium qui serait non toxique.

Les discordances que nous avons relevées entre K et Rb nous conduisent à partager l'opinion, de plus en plus répandue, que Rb n'est pas un simple traceur de K (Dorup Clausen, 1994 ; Pivovarova *et al.*, 1993) mais qu'il possède sans doute un rôle propre (Leblondel *et al.*, 1986). Nos travaux confirment pleinement, de ce point de vue, ceux de Dietz & Byrne (1990), menés sur des lamellibranches dulçaquicoles des États-Unis : alors que ces animaux sont, contrairement aux huîtres, capables de vivre longtemps dans de l'eau désionisée, ils se révèlent très sensibles à l'excès de potassium et montrent des dynamiques d'incorporation du rubidium différentes de celles du potassium. Cette convergence de résultats entre animaux marins et dulçaquicoles pourrait représenter un caractère particulier aux lamellibranches, ce que devraient vérifier des expériences sur d'autres Invertébrés aquatiques. Mais des différences importantes entre Rb et K ont également été observées avec des cellules malpighiennes d'insectes (Pivovarova *et al.*, 1994), ce qui tendrait à indiquer que la spécificité du rubidium s'étend aux invertébrés terrestres.

Conclusions

L'expérience a été entreprise dans le but de vérifier si, à l'image des vertébrés terrestres, un invertébré marin comme

Figures 9 et 10. **Branchie** d'une huître placée dans une eau enrichie à 0,3 g.l⁻¹ de rubidium (3,5 mM Rb⁺) pendant 7 jours. Fig. 9 : 12⁺ (C) (2 x 10⁻¹⁶ A ; 3 mn). Fig. 10 : 85⁺ (Rb) (2 x 10⁻¹⁷ A ; 20 mn).

La distribution du rubidium dans la branchie est uniforme.

Figures 11 et 12. **Paroi du tube digestif** d'une huître placée dans une eau enrichie à 1 g.l⁻¹ de rubidium (11,7 mM Rb⁺) pendant 21 jours. Fig. 11 : 23⁺ (Na) (2 x 10⁻¹⁴ A ; 10 s). Fig. 12 : 85⁺ (Rb) (2,5 x 10⁻¹⁶ A ; 3 mn).

Figures 13 et 14. **Tissu conjonctif vésiculeux** d'une huître placée dans une eau enrichie à 0,3 g.l⁻¹ de rubidium (3,5 mM Rb⁺) pendant 24 heures. Fig. 13 : 23⁺ (Na) (2,5 x 10⁻¹⁵ A ; 20 s). Fig. 14 : 85⁺ (Rb) (4 x 10⁻¹⁷ A ; 20 mn).

Figures 15 et 16. **Manteau** d'une huître placée dans une eau enrichie à 3 g.l⁻¹ de rubidium (35 mM Rb⁺) pendant 7 jours. Fig. 15 : 23⁺ (Na) (8 x 10⁻¹⁶ A ; 50 s). Fig. 16 : 85⁺ (Rb) (1,5 x 10⁻¹⁷ A ; 15 mn).

Noter l'importance de l'émission du rubidium sur la face externe de l'épithélium. Cette bioaccumulation, qui ne s'observe pas sur le cliché potassium (non montré), correspond à des mucosités acides (répondant positivement au Bleu Alcian) et peut traduire une adsorption directe du rubidium de l'eau de mer.

Figures 9 and 10. **Gills** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 0.3 g.l⁻¹ of rubidium (3,5 mM Rb⁺) for 7 days; Fig. 9 : 12⁺ (C) (2 x 10⁻¹⁶ A; 3 mn); Fig. 10 : 85⁺ (Rb) (2 x 10⁻¹⁷ A; 20 mn);

Rubidium is uniformly distributed in the gills.

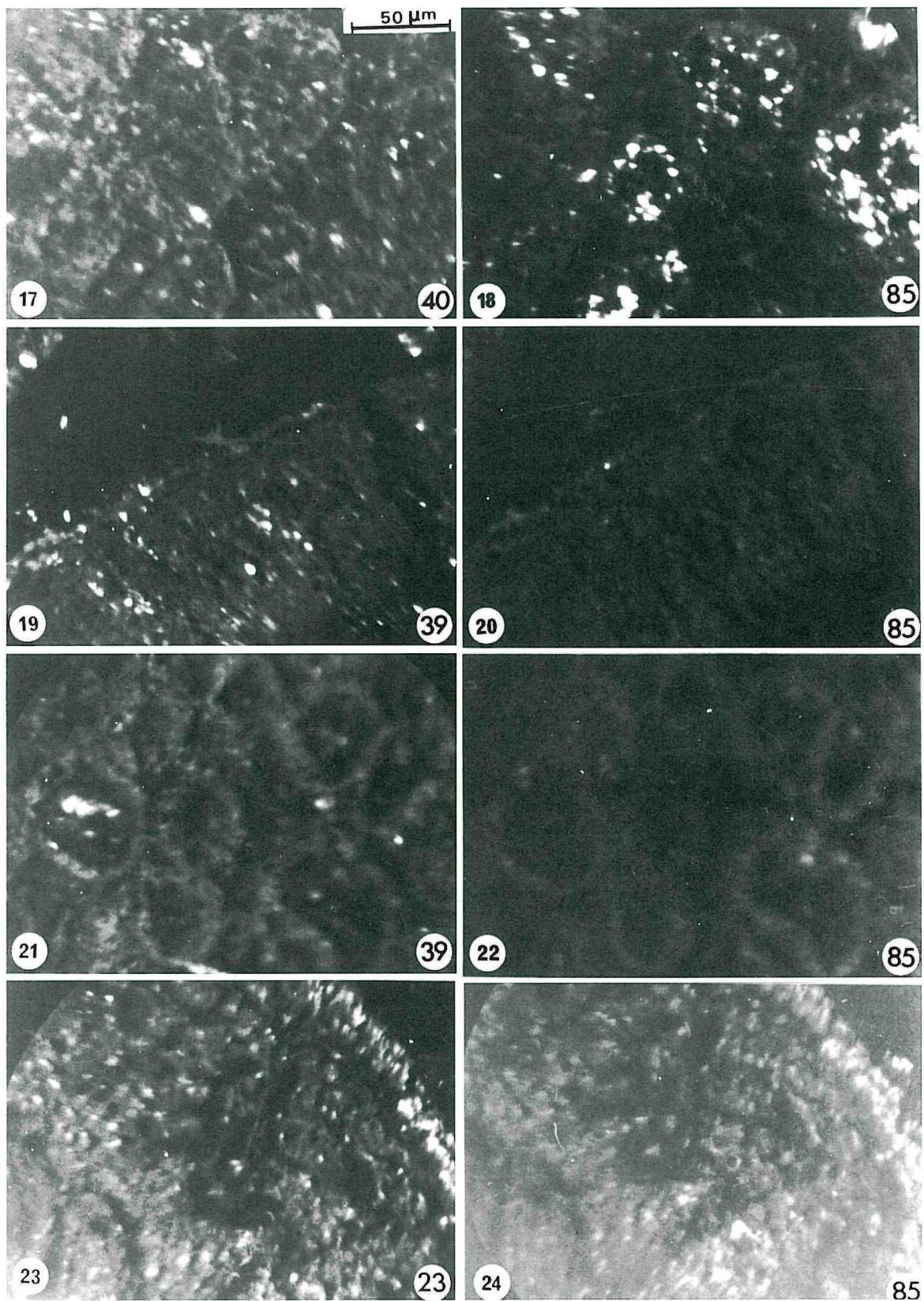
Figures 11 and 12. **Wall of the digestive tract** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 1 g.l⁻¹ of rubidium (11,7 mM Rb⁺) for 21 days; Fig. 11 : 23⁺ (Na) (2 x 10⁻¹⁴ A; 10 s); Fig. 12 : 85⁺ (Rb) (2,5 x 10⁻¹⁶ A; 3 mn).

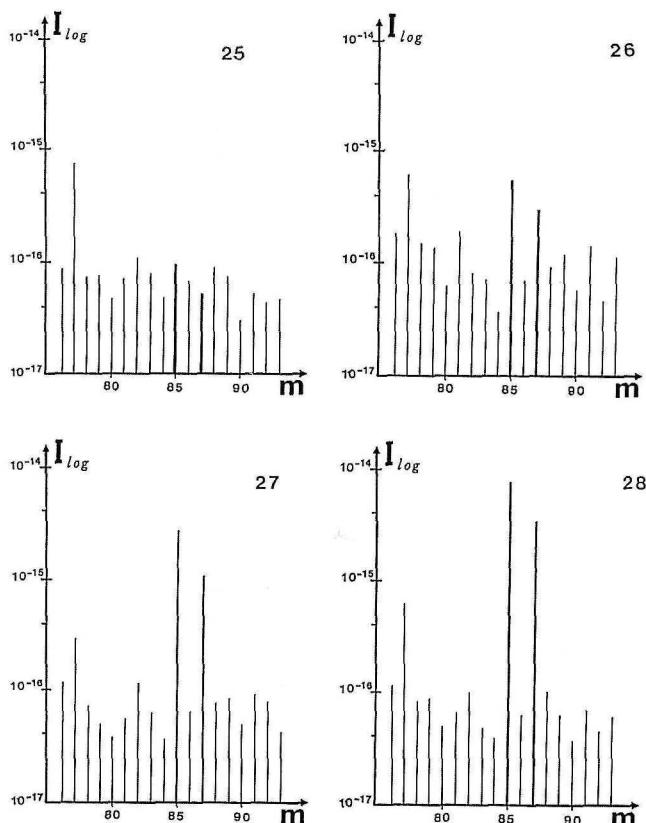
Figures 13 and 14. **Vesicular connective tissue** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 0,3 g.l⁻¹ of rubidium (3,5 mM Rb⁺) for 24 hours; Fig. 13 : 23⁺ (Na) (2,5 x 10⁻¹⁵ A; 20 s); Fig. 14 : 85⁺ (Rb) (4 x 10⁻¹⁷ A; 20 mn).

Figures 15 and 16. **Mantle** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 3 g.l⁻¹ of rubidium (35 mM Rb⁺) for 7 days; Fig. 15 : 23⁺ (Na) (8 x 10⁻¹⁶ A; 50 s); Fig. 16 : 85⁺ (Rb) (1,5 x 10⁻¹⁷ A; 15 mn).

Rubidium is intensely emitted by the outer face of the epithelium.

This bioaccumulation is not observed on the potassium image (not presented here). It corresponds to a layer of acid polysaccharides (characterized by the Alcian Blue reaction) and may represent an adsorption of rubidium.





Figures 25 à 28. Reproduction (échelles semi-logarithmiques) de spectres en basse résolution en masse ($M/dM = 300$) dans la région des masses 75^+ à 95^+ . Les masses des deux isotopes du rubidium (85 et 87) sont soulignées en traits gras pour être mieux visibles (mesures globales).

Fig. 25. **Glande digestive d'huître non traitée** ($t = 0$). Les intensités d'émission (I) aux masses (m) des isotopes du rubidium sont proches de celles des masses environnantes, dont elles ne se démarquent pas. Seule la haute résolution en masse permettrait de préciser s'il y a du rubidium dans ces tissus. Fig. 26. **Tissu conjonctif vésiculeux** d'huître placée dans une eau enrichie à $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ de rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) pendant 24 heures. Les intensités d'émission aux masses des isotopes du rubidium se démarquent nettement et indiquent un début de charge pondérale du tissu. Fig. 27. **Glande digestive d'huître** placée dans un milieu enrichi à 3 g.l^{-1} de rubidium (35 mM Rb^+) pendant 24 heures. Noter la forte intensité d'émission aux masses du rubidium qui peut ainsi être identifié sans risque d'erreur. Fig. 28. **Muscle** d'huître placée dans un milieu enrichi à 1 g.l^{-1} de rubidium ($11,7 \text{ mM Rb}^+$) pendant 7 jours. Les intensités, supérieures à celles de la figure précédente, montrent l'importance de la charge pondérale du tissu.

Figures 25 to 28. Reproduction of mass spectra, from mass 75^+ to mass 95^+ (Y axis : logarithmic scale). Spectra are recorded from oyster tissues at low mass resolution ($M/dM = 300$) from the same tissue surface as the images. The two rubidium isotopes (85^+ and 87^+) are enhanced.

Fig. 25. **Digestive gland** of non-treated oyster ($t = 0$). The intensities (I) of ions emitted at masses (m) 85^+ and 87^+ are low and undistinguishable from the other ions. To verify the presence of rubidium ions, besides C_8H (85^+) or $C_8H_3 - C_7NH$ (87^+), it would be necessary to set up high mass resolution ($M/dM = 2000$). Fig. 26. **Vesicular connective tissue** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ of rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) for 24 hours. The rubidium picked-up by the oyster tissue enhances the spectral intensities and makes the two rubidium isotopes distinguishable from the other ions. Fig. 27. **Digestive gland** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 3 g.l^{-1} of rubidium (35 mM Rb^+) for 24 hours. A higher dose during the same time results in higher intensities and the identification of rubidium is clear. Fig. 28. **Muscle** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 1 g.l^{-1} of rubidium ($11,7 \text{ mM Rb}^+$) for 7 days. The high intensities demonstrate the importance of the tissue loading.

Figures 17 et 18. **Glande digestive** d'une huître placée dans une eau enrichie à $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ de rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) pendant 28 jours. Fig. 17 : 40^+ (Ca) ($5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s). Fig. 18 : 85^+ (Rb) ($8 \times 10^{-17} \text{ A}$; 10 mn).

Des concentrations d'émission à la masse 85^+ sont bien visibles sur un fond d'émission moins intense correspondant à une distribution uniforme. Ces bioaccumulations sont spécifiques : elles ne se retrouvent pas sur le cliché potassium (non montré).

Figures 19 et 20. **Paroi du tube digestif** de la même huître ($0,3 \text{ g.l}^{-1}$, $3,5 \text{ mM Rb}^+$, 28 j.). Fig. 19 : 39^+ (K) ($6,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s). Fig. 20 : 85^+ (Rb) ($1,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 4 mn).

Figures 21 et 22. **Glande digestive** d'une huître placée dans une eau enrichie à 3 g.l^{-1} de rubidium (35 mM Rb^+) pendant 24 heures ; Fig. 21 : 39^+ (K) ($6 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s). Fig. 22 : 85^+ (Rb) ($1,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 3 mn).

Noter l'importance de l'émission à la masse 85^+ après 24 h de traitement. La distribution du rubidium est uniforme dans ce tissu.

Figures 23 et 24. **Cœur** d'une huître placée dans une eau enrichie à $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ de rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) pendant 28 jours (même animal que pour les clichés 17 à 20). Fig. 23 : 23^+ (Na) ($3 \times 10^{-15} \text{ A}$; 20 s). Fig. 24 : 85^+ (Rb) ($3 \times 10^{-16} \text{ A}$; 3 mn).

Figures 17 and 18. **Digestive gland** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ of rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) for 28 days; Fig. 17 : 40^+ (Ca) ($5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s); Fig. 18 : 85^+ (Rb) ($8 \times 10^{-17} \text{ A}$; 10 mn); *Rubidium is uniformly distributed, but some concentrations are observed.*

These bioaccumulations are specific for the rubidium : they are not visible on the potassium image (not presented here).

Figures 19 and 20. **Wall of the digestive tract**, same oyster used in Fig. 17 and 18; Fig. 19 : 39^+ (K) ($6,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s); Fig. 20 : 85^+ (Rb) ($1,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 4 mn);

Figures 21 and 22. **Digestive gland** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with 3 g.l^{-1} of rubidium (35 mM Rb^+) or 24 hours; Fig. 21 : 39^+ (K) ($6 \times 10^{-16} \text{ A}$; 100 s); Fig. 22 : 85^+ (Rb) ($1,5 \times 10^{-16} \text{ A}$; 3 mn);

Rubidium is uniformly distributed and the emission is intense despite the short exposure time.

Figures 23 and 24. **Heart** from an oyster that had been incubated in seawater enriched with $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ of rubidium ($3,5 \text{ mM Rb}^+$) for 28 days (same animal used in Figs. 17 to 20); Fig. 23 : 23^+ (Na) ($3 \times 10^{-15} \text{ A}$; 20 s); Fig. 24 : 85^+ (Rb) ($3 \times 10^{-16} \text{ A}$; 3 mn).

l'huître pouvait accumuler de grandes quantités de rubidium, sans dommage apparent pour les tissus.

Nos résultats montrent clairement que l'huître est, effectivement, apte à accumuler de grandes quantités de rubidium, comme les vertébrés terrestres. Cette accumulation se révèle sévèrement toxique mais il est possible que, dans les conditions de l'expérience, cette toxicité soit due au déséquilibre ionique. Ce point mérite une nouvelle expérimentation.

L'interchangeabilité K - Rb est importante, comme l'attestent les intensités d'émission ionique du rubidium, et les membranes cellulaires ne discriminent donc pas les deux métaux alcalins. L'état des tissus mous révèle une importante souffrance physiologique des animaux avec, notamment, la perte de leurs réserves glycogéniques.

Nos résultats montrent également, notamment sur images ioniques, des différences locales d'accumulation entre Rb et K, qui confirment d'autres travaux selon lesquels le mimétisme des deux métaux alcalins n'est pas absolu et que l'utilisation de Rb comme traceur de K doit être menée avec précaution.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique d'Anny ANGLO.

References

- Alexander G.J. & Meltzer H.L. 1975.** Onset of Audiogenic Seizures in Rodents after Intake of Near-Toxic Doses of Rubidium. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **194** (3) : 480-487.
- Ballan-Dufrançais C., Jeantet A.Y. & Coulon J. 1990.** Cytological features of mussels (*Mytilus edulis*) *in situ* exposed to an effluent of the titanium dioxide industry. *Annales de l'Institut Océanographique de Paris*, **66** (1-2) : 1-18.
- Bartschat D.K. & Blaustein M. P. 1985.** Potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Journal of Physiology* (London), **361** : 419-440.
- Delamarre P. & Truchet M. 1984.** Comparative Study of Mercury and Cadmium Exposure in a Fresh-Water Fish, *Brachydanio rerio* ; Histological Microanalysis of Cd-Induced Concretions. *Vie et Milieu*, **34** (2-3) : 79-86.
- Dietz T.H. & Byrne R.A. 1990.** Potassium and Rubidium Uptake in Freshwater Bivalves. *Journal of Experimental Biology*, **150** : 395-405.
- Dorup I. & Clausen T. 1994.** ^{86}Rb is not a reliable tracer for potassium in skeletal muscle. *Biochemical Journal*, **302** : 745-751.
- Javillier M., Polonovsky M., Florkin M., Boulanger P., Lemoigne M., Roche J. & Wurmser R. 1959.** *Traité de Biochimie Générale*. Masson Ed., Paris.
- Leblondel G., Leguay D., Robert D., Wartel R. & Allain P. 1986.** Study of Diurnal Variations of Plasma Concentrations and Human Urinary Excretion of Rubidium. *Biological Trace Elements Research*, **9** : 243-249.
- Lombeck I., Kasperek K., Feinnendegen L.B. & Bremer H.J. 1980.** Rubidium - A Possible Trace Element. 1. The Rubidium Content of Whole Blood of Healthy and Dietetically-Treated Children. *Biological Trace Elements*, **2** (49B) : 39-42.
- Martoja R. & Martoja M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Ed., Paris.
- Pivovarova N., Anstee J.H. & Bowler K. 1993.** The Use of Rb in a Study of Cell Function in Malpighian Tubules of Locusts by X-Ray Microanalysis. *Cell Biology International*, **17** (10) : 971-972.
- Pivovarova N., Marshall S.L., Anstee J.H. & Bowler K. 1994.** An X-Ray microanalysis study of *Locusta* Malpighian tube cell function using rubidium. *American Journal of Physiology*, **266**, R1551-R1561.
- Truchet M. 1975.** Application de la microanalyse par émission ionique secondaire aux coupes histologiques : localisation des principaux isotopes de divers éléments. *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire*, **24** (1) : 1-22.
- Truchet M. 1982.** Étude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman ; méthodologie et exemples d'application. *Thèse Doctorat État*, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Truchet M. 1983.** Essai d'analyse quantitative par émission ionique secondaire sur coupes histologiques. In : Actes du Xth International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis (ICXOM - X, Toulouse, 1983). *Journal de Physique, Colloque C2, Supplément n° 2*, **45** : 533-536.
- Truchet M. 1984.** Recherche, par émission ionique secondaire, du rubidium dans quelques tissus d'un mammifère (la souris) après intoxication expérimentale. *Journal de Microscopie et de Spectroscopie Électronique*, **9** (6) : 513-525.
- Wilcox S.J. & Dietz T.H. 1995.** Potassium transport in the freshwater bivalve *Dressena polymorpha*. *The Journal of Experimental Biology*, **198** : 861-868.