

Note d'information

**APPROCHE MORPHOLOGIQUE DE L'ÉCREVISSE  
ASTACUS ASTACUS L. 1758 ASSOCIÉE À L'IMAGERIE  
(TOMOSCANNER ET ÉCHO-DOPPLER) ET AUX TECHNIQUES  
IMMUNOHISTOCHIMIQUES.**

**T.M. BENYAHIA (1), A.M. BELABBAS (2), H. BENSAID (3), M. AMRANI (2),  
A. BENJELLOUN (3), A. SEMLALI (3)**

---

(1) Faculté des Sciences Sidi Mohamed Ben Abdellah, FÈS, Maroc.

(2) Institut National d'Oncologie Sidi Mohamed Ben Abdellah, RABAT, Maroc.

(3) Centre radiologie Bellevue, RABAT, Maroc.

Reçu le 16 février 2001

Accepté le 22 mai 2002

Received 16 February, 2001

Accepted 22 May, 2002

## RÉSUMÉ

Après avoir souligné, d'une manière concrète, les difficultés de la dissection et le repérage par les méthodes classiques, nous avons essayé dans ce travail d'aborder l'apport de la macroscopie indirecte de l'animal grâce à la radiologie (échographie, tomoscanner, lavement baryté) afin de vérifier les données anatomiques sur l'écrevisse à pattes rouges, complété par des techniques microscopiques.

Dans notre travail, l'adaptation pour l'écrevisse de techniques nouvelles de radiologie (tomoscanner et échographie) complétées par les études d'histologie (colorations et immunohistochimie) ont permis de se rendre compte des possibilités qu'elles offrent pour l'exploration dynamique et le repérage précis des organes et pour le diagnostic de maladies histopathologiques et ceci sans porter atteinte à l'animal.

Le but de cette approche est de mettre au point des moyens d'investigation sur l'animal vivant pour mieux cerner les éventuels états pathologiques touchant surtout ses organes profonds et contribuer ainsi à préserver cette espèce menacée par la pollution des milieux astacicoles et par la sécheresse persistante que connaît le Maroc ces dernières années.

**Mots-clés :** *Astacus astacus* L. 1758, morphologie, scanner, écho-doppler, immunohistochimie.

**MORPHOLOGICAL APPROACH OF *ASTACUS ASTACUS* L. 1758  
USING CAT-SCAN, DOPPLER-ULTRASOUND AND  
IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUES.**

**ABSTRACT**

Having underlined, in a concrete way, the difficulties of the autopsy and the location of the organs by classical methods, we tried in this work to approach the contribution of the indirect macroscopy of the animal using radiology (ultrasound/Cat-Scan) to verify the anatomical data on the noble crayfish completed by microscopic techniques.

In our work, adaptation for the crayfish of new radiological techniques (Cat-Scan and ultrasound) completed by the studies of histology (routine and special stains and immunohistochemistry) allowed to realize the possibilities that they offer for the dynamic investigation and the precise location of organs and for the diagnosis of histopathological diseases this without striking a blow at the animal.

The purpose of this approach is to work out means of investigation on the alive animal to better determine the possible pathological states especially in its deep organs and to contribute so to protect this specie threatened by the pollution of the crayfish habitat and by the persevering aridity which strikes Morocco these last years.

**Key-words :** *Astacus astacus* L. 1758, morphology, Cat-Scan, doppler ultrasound, immunohistochemistry.

**INTRODUCTION**

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du programme de développement de l'astaciculture au Maroc par le Centre National d'Hydrobiologie et de Pisciculture d'Azrou. Les essais entrepris pour développer un élevage d'écrevisses à pieds rouges est jusqu'à présent resté peu opérationnel de part les difficultés rencontrées particulièrement les phénomènes pathologiques responsables de mortalités assez importantes. Ainsi l'étude de ce point nous semble actuellement fondamentale pour développer nos connaissances, et acquérir les moyens qui permettraient de limiter les mortalités aussi bien en élevage qu'au sein des populations naturelles. Par ailleurs, les études morphologiques de l'écrevisse à pieds rouges *Astacus astacus* L. 1758, suscitent un intérêt particulier notamment sur le plan scientifique et historique. Depuis la description princeps de certains auteurs du 18<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> siècle, les travaux n'ont fait que confirmer les données de ces auteurs en dépit de la difficulté de la dissection avec les moyens limités de l'époque. Nos tentatives de dissection laborieuses, en suivant une méthodologie rigoureuse citée par plusieurs auteurs, ne nous ont pas permis de séparer convenablement les divers organes. Pour contourner ces difficultés, nous avons eu recours à des techniques d'imagerie et pour nous guider à réaliser des coupes histologiques.

L'objectif de ce travail est de déterminer sur l'animal vivant les éventuels états pathologiques, notamment au niveau des organes profonds, mais aussi de disposer d'une iconographie de base précise pour les études anatomopathologiques.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Macroscopie indirecte

#### *Technique d'imagerie par échographie (Photos 1 à 3)*

Elle est utilisée pour un repérage précis des organes profonds particulièrement le système vasculaire. Nous nous sommes servis des techniques d'imageries échographiques en utilisant un échographe PHILLIPS de type ST800 avec codage doppler couleur permettant de mesurer le décalage temporel entre deux échos successifs réfléchis par un même amas de cellules « sanguines » et surtout doppler puissance basé sur l'énergie du signal rétrodiffusé par les cellules « sanguines », ce dernier étant plus sensible pour les flux lents. L'échographe est équipé d'une sonde de 7,5 Hz et une interface de type « Kit-écho ». Nous avons également utilisé une poche à eau couplée à la sonde pour augmenter la fréquence afin de repérer les organes superficiels.

#### *Tomoscanner (Photos 4 à 6)*

Nous avons utilisé un appareil de type Tomo-scan EG PHILLIPS avec rotation continue, réalisant des coupes millimétriques de 3 mm d'épaisseur, passant par le céphalothorax et l'abdomen. L'animal est légèrement anesthésié et immobilisé dans une petite boîte en plastique. Nous avons procédé dans un premier temps à l'injection de 1 cc de radiosélectant à 76 % (produit iodé à usage vasculaire), avec une aiguille très fine au niveau de la cavité cardiaque. Celle-ci a été préalablement repérée par échographie, avec prise de clichés tomodynamométriques (T.D.M.) à différents niveaux de sections T.D.M.

#### *Transit baryté (Photos 7, 8)*

Cette technique est utilisée pour visualiser le tube digestif. L'estomac et le tube digestif ont été opacifiés par de la baryte donnée par voie orale et par voie basse à l'aide d'une aiguille à bout mousse de 22 G (inframillimétrique). Des clichés radiologiques ont été pris dans le plan latéral et antéro-dorsal.

### Microscopie

A défaut de descriptions histologiques précises dans la littérature, nous nous sommes basés sur nos constatations comparées à l'histologie normale d'autres espèces connues. L'immunohistochimie nous a permis de préciser la nature des tissus étudiés.

#### *Techniques histologiques*

##### *Fixation*

La durée de la fixation étant de 24 heures, les fixateurs utilisés sont :

- alcool absolu pour durcir les tissus mous et préserver les sites antigéniques.
- A.F.A. (alcool absolu formaldéhyde et acide acétique) pour préserver les sites antigéniques.

La décalcification a été évitée pour ne pas fragiliser et modifier la morphologie des tissus mous.

##### *Coloration*

Cette étape a été précédée par les processus d'inclusion comportant quatre étapes (la déshydratation des pièces, la clarification, l'imprégnation par la paraffine et le coulage

sous forme de bloc), de microtomie à l'aide d'un microtome rotatif et enfin d'étalement des coupes. Les colorants utilisés sont :

- Hémateine éosine (HE) : coloration standard pour la morphologie,
- P.A.S. (Périodic Acid Schiff) et musicarmin pour détecter les cellules musipares et celles contenant du glycogène,
- Trichrome de Masson : colore en vert les fibres de collagène.

Les observations de ces lames ont été faites sous microscope optique avec prise de photos.

#### *Techniques histochimiques*

Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux de type immunothec et Dako dirigés contre des antigènes spécifiques pour identifier les tissus. Cette technique est basée sur l'utilisation du complexe peroxydase-antiperoxydase (P.A.P.). Les marqueurs utilisés sont :

- l'antifacteur VIII, pour identifier les cellules endothéliales au niveau du cœur et des vaisseaux,
- l'anti CD34, plus spécifique des cellules endothéliales,
- l'anticytokératine, marqueur spécifique du cytosquelette des cellules épithéliales.
- la neurone spécifique éolase (N.S.E.), marqueur spécifique des cellules nerveuses.
- la protéine gliale fibrillaire acide (P.G.F.A.), pour le marquage des neurones et des fibres nerveuses.
- l'antiactine du muscle lisse dirigée contre les cellules musculaires.
- l'antidesmine, marqueur des cellules musculaires striées.

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### **Echographie-Doppler**

L'échographie réalisée sur l'animal vivant montre de façon nette les contractions du sac cardio-péricardique au niveau de la région dorsale du céphalothorax (Photo 2). Cet organe sert de repère pour reconnaître les lobes de la glande génitale sur laquelle il repose, chez le mâle comme chez la femelle. Ces observations confirment les descriptions anatomiques existantes. Au centre, nous avons également pu repérer juste en dessous du cœur et des glandes génitales le complexe hepatopancréatique qui apparaît à l'échographe sous forme d'une structure grossièrement rectangulaire d'échostructure tissulaire hétérogène.

Une étude dynamique nous a permis de filmer et d'enregistrer le son des battements cardiaques ainsi que le rythme, ce qui pourrait constituer un indice de comparaison.

### **TDM**

Les clichés sériés recueillis par le scanner sont répertoriés par des numéros correspondant aux divers plans de coupes et permettent de montrer que :

- la cavité cardiaque est antérieure, elle apparaît sous forme d'une cavité hypodense (densité liquidienne) en arrière de laquelle apparaît une zone dense de densité tissulaire correspondant au bloc hépatopancréatique (Photo 5),

- dans une coupe plus basse la cavité cardiaque est divisée en deux, correspondant à la division de l'artère abdominale en deux artères pour les membres droits et gauches. Les artères apparaissent sur les clichés T.D.M. sous formes de structures hyperdenses donc vasculaires (Photo 6).

### **Transit baryté**

Le cliché radiologique pris dans le plan latéral après opacification à la baryte montre un œsophage court formant un angle droit avec l'entrée de l'estomac confirmant les données anatomiques existantes (Photo 7).

Le cliché pris dans le plan antéro-dorsal montre la bouche, l'estomac, l'intestin et l'anus (Photo 8). L'usage de couches minces pourrait également améliorer la qualité de l'image.

### **Histologie et immunohistochimie**

#### *Oesophage Estomac*

L'estomac est soutenu par des faisceaux de muscles lisses adhérents intimement aux lamelles de chitine et de dents (Photos 9 et 10). Il comporte également une partie muqueuse épithéliale, revêtue d'un épithélium cylindrique. Ce système permet de broyer les aliments, que l'on retrouve dans la lumière gastrique sous forme d'un matériel amorphe éosinophile aux colorations standards. On observe également des espèces de formations violacées de forme discoïdale : ce sont les gastrolithes (Photo 11).

#### *Complexe hépatopancréatique*

Le foie se situe au niveau de la région dorsale, il est formé de travées d'hépatocytes bordés de capillaires sinusoïdes. Ces cellules sont dotées d'un noyau central rond et d'un cytoplasme granuleux éosinophile bien limité par une membrane cytoplasmique. Le pancréas est formé de glandes bordées de cellules à cytoplasme vacuolaire, mêlées au parenchyme hépatique (Photos 12 et 13).

#### *Intestin*

L'intestin grêle est tapissé de villosités centrées d'un axe conjonctif fin et limité extérieurement par des enterocytes cylindriques munis de bordures en brosses apicales et des noyaux ronds centraux ou basaux identiques à celles de l'intestin humain. Il s'y associe de rares cellules mucipares P.A.S. positifs (Photos 14 et 15).

Le gros intestin est tout à fait comparable à celui du colon humain, reconnaissable par son épithélium de surface cylindrique crypte et des glandes ressemblant à celles de Lieberkuhn. Nous ne nous sommes pas intéressés aux éventuelles cellules endocrines mises en évidence par la chromogranine (Photos 16 et 17) et la coloration Grimélius.

#### *Cavité cardio-péricardique*

La Cavité cardio-péricardique est bordée d'une paroi mince, soutenue par des fibres musculaires. La cavité est tapissée intérieurement par des cellules endothéliales aplaties, ces dernières réagissent positivement avec le facteur VIII et le CD 34. L'artère abdominale est également tapissée par des cellules endothéliales (Photos 18 et 19).

### *Hémolymphe*

Elle est formée de plasma, contenant de grosses cellules amiboïdes nucléées à cytoplasme éosinophile foncé (Photo 20). Le plasma coagulé montre des écheveaux comparables à des filaments de fibrine rouge aux colorations standards (Photo 12).

### *Branchies*

Les branchies sont des structures chitinisées en surface avec présence de cellules amiboïdes (Photos 21 et 22).

### *Gonades*

Le testicule est formé de canaux seminipares, bordés d'un revêtement cylindrique évoquant les cellules de Sertolie. Leur lumière contient le liquide séminal (Photo 23).

L'ovaire est constitué de petite formations arrondies contenant des ovules et cernées d'une fine membrane (Photo 24).

### *Système nerveux*

Le système nerveux est fait de plusieurs relais de ganglions sympathiques grossièrement arrondis, composés de neurones, qui sont de grosses cellules polygonales avec extrémité effilée, munis de noyaux centraux et d'un nucléole proéminent. Leur cytoplasme est éosinophile (Photos 25 et 26). Ces ganglions sont isolés ou en amas dans le ganglion central et parfois mêlés au muscle abdominal sous forme de plexus ou chaîne périphérique. Ils sont NSE positif, leur structure est identique aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau des autres relais disposés à la partie ventrale de l'écrevisse. Ils sont GFA positifs (Photos 27 et 28).

### *Appareil excréteur*

L'appareil excréteur est fait d'un peloton de canaux bordés de cellules cubiques. Ce peloton représente le tubule qui relie la vessie au labyrinthe (Photo 29).

### *Muscle dorsal et épiderme*

Le muscle dorsal est formé de fibres striées transversalement (Photo 30). L'épiderme est situé entre deux membranes basales, l'une profonde fine, l'autre superficielle non calcifiée. Plus haut, en allant de l'intérieur vers l'extérieur, nous distinguons une endocuticule stratifiée aux lamelles un peu espacées et surmontées d'une exocuticule aux lamelles plus denses. Dans la zone dorsale le muscle adhère à la membrane basale inférieure de l'épiderme (Photo 31).

## **CONCLUSION**

L'objectif de ce travail préliminaire est d'attirer l'attention des chercheurs sur des moyens d'investigation leur permettant des microdosages.

En effet, le développement actuel de la spectrométrie de masse (*a layerson's guide to Tandem mass spectrometry and newborn screening. Neo and gen screening, page 1-5*), couplée à l'ordinateur, permet d'identifier diverses substances physiologiques et de les doser. Aussi, nous avons jugé utile, grâce aux microprélèvements, de mieux connaître la physiologie de l'animal dans son biotope en le gardant vivant. Il en est de même pour d'éventuelles substances toxiques qui peuvent polluer les cours d'eau et l'animal.

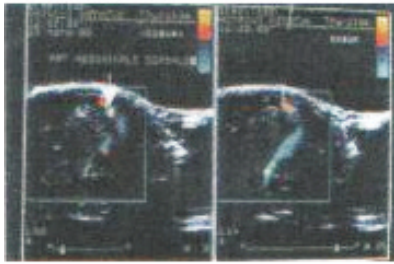


Photo. 1 : Echographie Doppler couleur - sonde couplée à la poche à eau pour le repérage des organes superficiels.

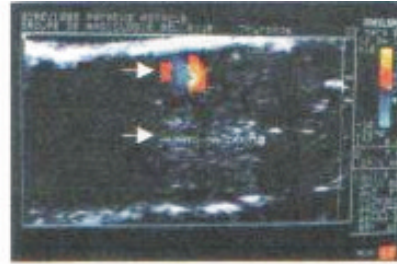


Photo. 2 : Echographie Doppler couleur - les flèches montrent les contractions du sac cardiopéri-cardique et l'hépatho-pancréas.

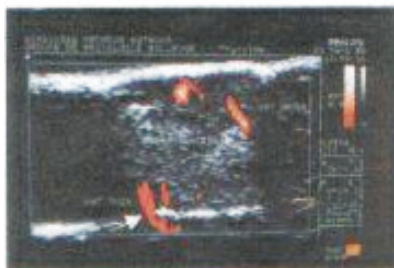


Photo. 3 : Echographie Doppler puissance - la flèche montre l'artère sternale.



Photo. 4 : Topogramme Scanner montrant l'écrevisse et les coupes millimétriques réalisées.



Photo. 5 : Cliché tomodensitométrique - la flèche montre le sac cardiopéri-cardique de structure hypodense.

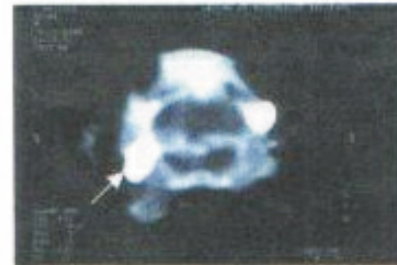


Photo. 6 : Cliché tomodensitométrique - la flèche montre l'artère sternale de structure hyperdense.



Photo. 7 : Opacification barytée - plan latéral montrant un œsophage court formant une angulation de 90° avec l'entrée de l'estomac.



Photo. 8 : Opacification barytée - plan ventral - les flèches montrant la bouche, l'estomac, l'intestin et l'anus.



Photo. 9 : Lames de chitine à la surface de l'estomac. coloration H.E. G x 20.



Photo. 10 : Dents du moulin gastrique. coloration H.E. G x 40.

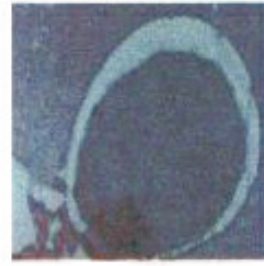


Photo. 11 : Gastrolithe. coloration H.E. G x 40.

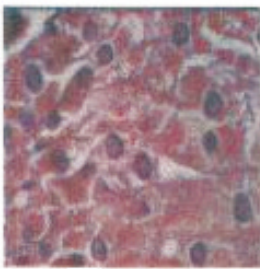


Photo. 12 : travées hépatocytaires. Coloration H.E. G X 40.

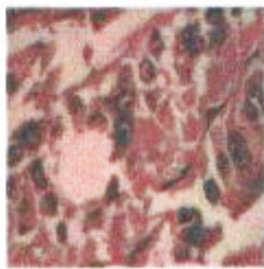


Photo. 13 : travées hépatocytaires centrées de glandes pancréatiques. coloration H.E. G x 40.



Photo. 14 : Intestin avec bordures en brosse. coloration PAS. G x 40.



Photo. 15 : Villosité de l'intestin grêle. Immunomarquage par le KLI. G x 40.



Photo. 16 : Glandes de Lieberkuhn au niveau de l'intestin postérieur coloration H.E. G x 20.



Photo. 17 : Glandes de Lieberkuhn au niveau de l'intestin postérieur. Immunomarquage par le KLI. G x 20.



Photo. 18 : Marquage de la paroi cardiaque par l'antifacteur VIII. G x 40.



Photo 19 : sac cardiaque avec les sinus ventraux et latéraux. coloration H.E. G x 40.

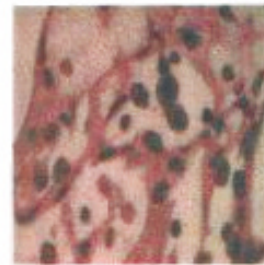


Photo 20 : Plasma contenant des cellules amiboïdes nucléées à cytoplasme éosinophile. Coloration H.E. Gx 20.





Photo 21 : Branchies. coloration H.E. G x 20.

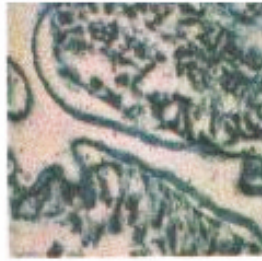


Photo 22 : Branchies avec des structures chitinisées en bordure. Coloration H.E. G x 20.

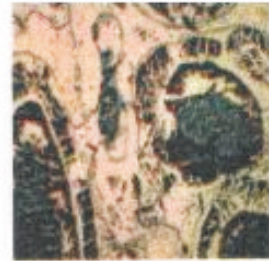


Photo 23 : Testicule avec canaux séminipares. Coloration Trichrome de Masson. Gx 40.



Photo 24 : Ovaires. Coloration H.E. G x 40.

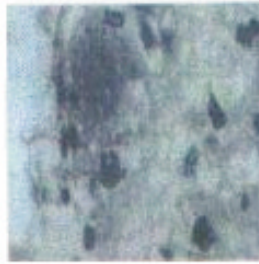


Photo 25 : Ganglion nerveux central. Immuno-marquage par la PGFA. G x 40.



Photo 26 : Neurones pourvus de nucléoles proéminents. Coloration H.E. G x 40.



Photo 27 : Ganglions nerveux périphériques. Immuno-marquage par la NSE. G x 40.

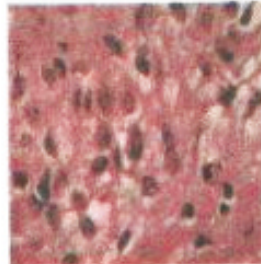


Photo 28 : Ganglions nerveux périphériques mêlés aux cellules musculaires. Coloration H.E. G x 20.



Photo 29 : Appareil excréteur - peloton de canaux urinaires. Coloration H.E. G x 20.



Photo 30 : Muscle dorsal strié. Coloration H.E. G x 20.

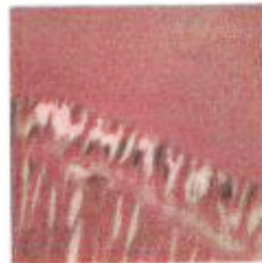


Photo 31 : Epiderme. coloration H.E. G x 40.

Photo 1

Color Doppler sonography - probe coupled to a water cavity to check superficial organs.

Photo 2

Color Doppler sonography - the arrow shows cardio-pericardic cavity contraction, liver and pancreas.

Photo 3

Color power sonography - the arrow shows sternal artery.

Photo 4

Topogram scanner showing the crayfish and the millimetric sections realized.

Photo 5

Scan film - the arrow shows the hypodense structure of cardiopericardic cavity.

Photo 6

Scan film - the arrow shows the hyperdense structure sternal artery.

Photo 7

Baryt opacification - Lateral surface showing angle of 90° between short esophagus and the stomach entry.

Photo 8

Baryt opacification, ventral section, the arrows show mouth, stomach, intestine and anus.

Photo 9

Chitine layers in stomach surface. Hematein eosin staining x 20.

Photo 10

Stomach teeth. Hematein eosin staining x 40.

Photo 11

Gastrolith. Hematein eosin staining x 20.

Photo 12

Hepatocyte cordon. Hematein eosin staining x40.

Photo 13

Hepatocyte cordon centred by pancreatic gland. Hematein eosin staining x40.

Photo 14

Small intestine with microvilli periodic acid Schiff staining x 40.

Photo 15

Small intestine villi. Immunohistochemical staining by cytokeratin antibody x 40.

Photo 16

Lieberkuhn gland in posterior intestine. Hematein eosin staining x 20.

Photo 17

Lieberkuhn gland in posterior intestine. Immunohistochemical staining by cytokeratin antibody x 20.

Photo 18

Cardiac wall, expression of VIII factor x 40.

Photo 19

Cardiac cavity with ventral and lateral sinus. Hematein eosin staining x 40.

Photo 20

Plasma containing ameboid cells with nucleus and dark eosinophilic cytoplasm. Hematein eosin staining x 40.

Photo 21

Branchies. Hematein eosin staining x 40.

Photo 22

Branchies with chitinised structures in the border. Hematein eosin staining x 40.

Photo 23

Testicle with seminipare canul. Masson trichrom staining x 40.

Photo 24

Ovary. Hematein eosin staining x 40.

Photo 25

Central nervous ganglia. Immunohistochemical staining by protein glial fibrillar acid antibody x 20.

Photo 26

Neuron with prominent nucleoli. Hematein eosin staining x 40.

Photo 27

Peripheric nervous ganglia. Immunohistochemical staining by neuron specific enolase x 40.

Photo 28

Peripheric nervous ganglia intermingled with muscle cells. Hematein eosin staining x 20.

Photo 29

Urinary tract, urinary canal. Hematein eosin staining x 20.

Photo 30

Dorsal skeletal muscle. Hematein eosin staining x 20.

Photo 31

Epidermis. Hematein eosin staining x 40.