

(Communication présentée le 15 octobre 1966.)

APPLICATION DE LA METHODE DE FIXATION-COLORATION DE MAILLET A CERTAINS INVERTÉBRÉS

par J. DEMAL et J. GILLOTEAUX.

Laboratoire de Morphologie animale, Louvain.

Résumé. — La technique de fixation-coloration mise au point par MAILLET à partir de la formule de CHAMPY a fourni des résultats intéressants pour la mise en évidence des fibres amyéliniques chez les Vertébrés. Ceci a incité les auteurs à appliquer cette technique à des Invertébrés, notamment des Mollusques; elle s'est révélée efficace.

INTRODUCTION.

L'intérêt témoigné par l'un d'entre nous pour la structure et la fonction des palpes labiaux chez les Lamellibranches a fait renaître un problème auquel nous nous étions longuement appliqué il y a une dizaine d'années : l'histologie nerveuse chez les Mollusques (DEMAL, 1955).

L'expérience de nombreux chercheurs démontre que l'utilisation des techniques d'histologie nerveuse exige des modalités d'application différentes chez les Vertébrés et les Invertébrés. Jusqu'à présent les différentes méthodes de coloration nerveuse, qui ont fourni une ample moisson de résultats chez les Vertébrés, se sont avérées moins efficaces chez les Invertébrés et en particulier chez les Mollusques.

Le fait qu'une technique de fixation-coloration s'est montrée apte à colorer des fibres amyéliniques chez les Vertébrés nous a incité à tenter de l'appliquer aux Mollusques d'abord, à d'autres Invertébrés ensuite.

TECHNIQUE.

CHAMPY avait mis au point, vers les années 1910-11, une technique de fixation à base de tétraoxyde d'osmium et de bichro-

mate de potassium. Par une erreur de manipulation il introduisit de l'iodure au lieu de bichromate de potassium. La solution résultant du mélange de deux liquides incolores prit une teinte jaune-orange; elle se révéla être non pas de l'iodure d'osmium, mais bien un mélange de sels complexes. CHAMPY eut la curiosité d'observer son action sur les tissus : elle colore des granules que les dérivés osmiés ne montrent pas, ces granules ne sont pas le chondriome qui se révèle par d'autres colorations à côté des granules; ces structures réagissent avec le fixateur de façon précise et constante; enfin les terminaisons nerveuses sont marquées comme par le bleu de méthylène, c'est-à-dire que les neurofibrilles n'apparaissent pas. CHAMPY (1918) et son école utilisèrent cette technique pour la mise en évidence des fibres nerveuses amyéliniques du système nerveux sympathique.

Les défauts de cette méthode sont l'inconstance des résultats, le manque de finesse de la coloration et l'impossibilité de mettre en évidence des fibres superficielles. Ceci amena MAILLET (1959) à tenter d'améliorer la technique.

CHAMPY avait montré que la propriété de former un complexe avec l'acide osmique était caractéristique de tous les iodures alcalins. MAILLET (1962, 1963) essaya donc ces iodures et de plus tous les iodures bivalents solubles ainsi que quelques iodures trivalents, sur un matériel identique : l'intestin grêle de rat. Les iodures alcalins s'avérèrent comparables à l'iodure de potassium : l'adventice et la musculature externe ne sont pas colorés et le plexus d'Auerbach ne l'est qu'imparfaitement. Les iodures de calcium, de zinc et de cadmium réalisent une bonne coloration superficielle de l'adventice et de la musculature. Les iodures trivalents testés sont inefficaces et forment rapidement un précipité. Parmi tous ces produits l'iodure de zinc semble le meilleur, car il accroît la sensibilité du réactif, permet une

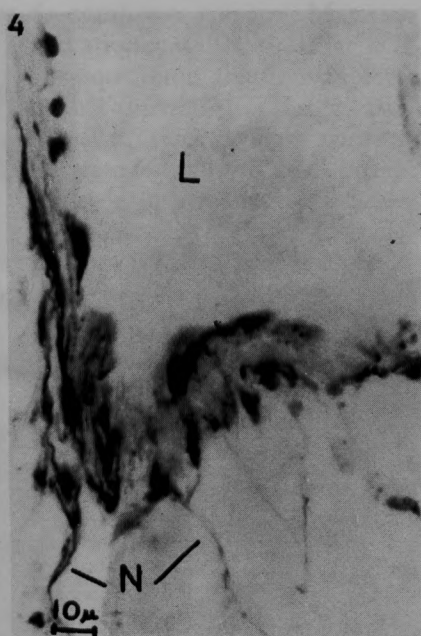
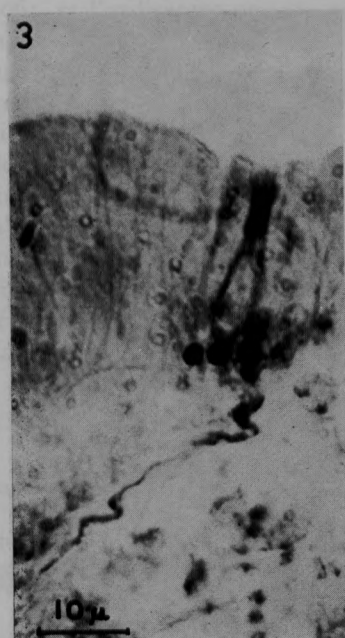
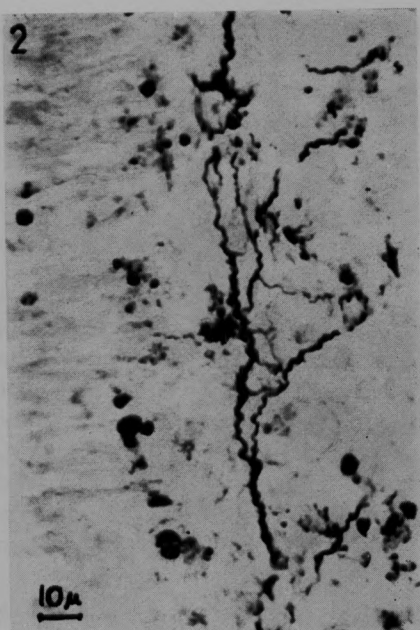
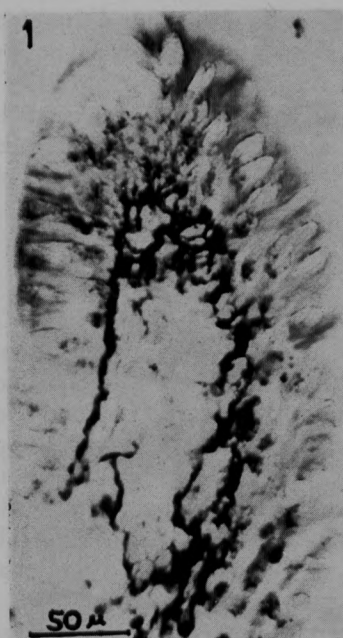
FIG. 1. — Plexus nerveux sub-épithélial. On observe des cellules à mucus piriformes non colorées dans l'épithélium.

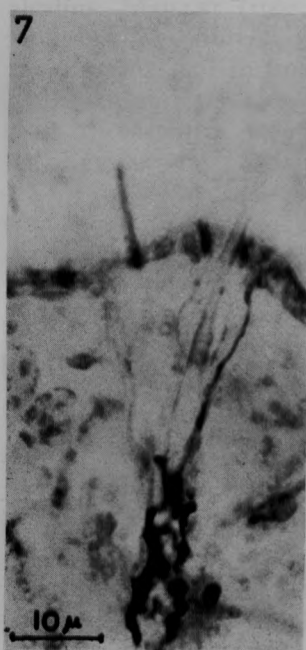
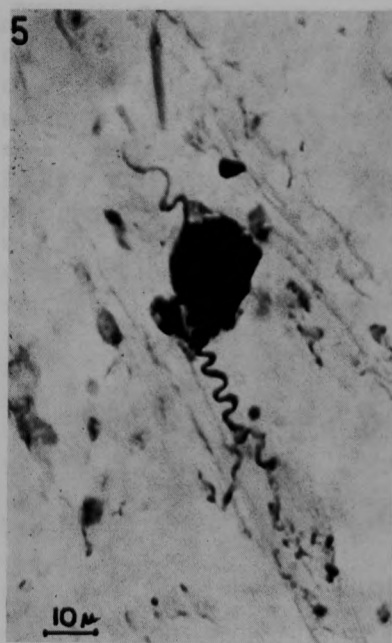
(Les figures 1 à 5 représentent des coupes à travers un palpe labial d'*Anodonta cygnea* L.)

FIG. 2. — Détail du même plexus sub-épithélial.

FIG. 3. — Près du sommet d'un pli principal du palpe, un prolongement nerveux se termine à la base d'une cellule neuro-épithéliale.

FIG. 4. — N = Prolongements nerveux aboutissant à un espace lacunaire (L).





coloration des fibres superficielles, favorise la finesse de la coloration et la constance des résultats.

Les objets doivent être débités en fragments d'environ 5 mm d'épaisseur (cette épaisseur pouvant varier d'après les organes) et plongés dans le fixateur préparé au moment de l'emploi de la façon suivante :

- 1 partie d'une solution de tétraoxyde d'osmium à 2 %,
- 4 parties d'une solution d'iodure de zinc à 3 %.

MAILLET recommande de préparer cette dernière solution à l'aide d'iode bisublimé, de poudre de zinc et d'eau distillée. Le temps de fixation ne peut excéder 24 heures; la température optimale est de 20 à 25°. Il peut être utile d'agiter doucement pendant la fixation et de tamponner la solution au véronal sodique pour ajuster le pH à 7,3-7,4. La pièce fixée est ensuite incluse à la paraffine. Si l'objet contient des tissus gras il est avantageux, après déparaffinage, de faire agir de l'essence de térébenthine pour dissoudre les graisses colorées par l'acide osmique.

La technique de MAILLET a été utilisée avec succès par un certain nombre d'auteurs sur du matériel Vertébré; il faut surtout citer JABONERO et coll. qui exposèrent leur méthode en 1961, et l'utilisèrent ensuite pour de nombreux travaux. MAILLET (1963) montra qu'en plus de la coloration axoplasmique et cellulaire du système nerveux autonome, une fixation prolongée (24 - 36 h) mettait en évidence l'appareil de Golgi. Par ailleurs le fixateur-colorant réagit aussi avec les couches cornées de la peau, l'endothélium des capillaires, les cellules de l'épithélium vaginal, les cellules superficielles de la vessie. La méthode n'est donc pas spécifique du système nerveux. Examinant le mode d'action du complexe, MAILLET prouva que l'ion actif était l'iode : le cyanure de potassium supprime en effet les propriétés particulières de la solution, les lipides seuls réagissant avec l'acide osmique; d'autre part, l'adjonction d'iode excédentaire

←

FIG. 5. — Cellule nerveuse bipolaire. Les prolongements nerveux se distinguent nettement des fibres conjonctives.

FIG. 6. — Coupe sagittale d'un Naïdidé. Cordon nerveux latéral et fibres transversales innervant les muscles circulaires.

FIG. 7. — Prolongements nerveux autour de la racine d'une soie ventrale d'un Naïdidé. On observe un autre prolongement aboutissant à l'épiderme.

FIG. 8. — Protocérébrum de *Calliphora erythrocephala*. MEIG. — Cellules neurosécrétrices.

permet de colorer des pièces supplémentaires avec la même solution. Par ailleurs, il ne semble pas que le complexe réagisse avec le médiateur chimique (adrénaline), car une fixation préalable par des substances oxydantes n'inhibe pas la coloration des fibres nerveuses amyéliniques. STACH (1961) avait déjà montré que la méthode n'est pas spécifique pour les fibres adrénergiques, mais agit sur tout le système nerveux autonome. CRUZ (1962) observa aussi que la réserpine n'empêche pas la coloration de fibres aussi bien adrénergiques que cholinergiques. MAILLET émet l'hypothèse d'une action du fixateur-colorant sur les lipoprotéines, se basant sur son affinité pour les corps de Golgi et pour les cellules α de l'hypophyse qui contiennent des granulations lipoprotéiques. Le réactif démasquerait les lipides des lipoprotéines et l'acide osmique pourrait alors réagir avec les lipides libérés. Signalons enfin que le fixateur étant favorable aux techniques de microscopie électronique, STOCKINGER et GRAF (1965) ont utilisé des pièces fixées au fixateur-colorant de MAILLET et tenté une interprétation histochemique du réactif. Leurs résultats ne sont que partiels : ils remarquent une légère diffusion du complexe dans toutes les cellules et une localisation plus précise dans les corps de Golgi, l'ergastoplasme, les mitochondries et à la périphérie des axoplasmes.

APPLICATION À L'ANODONTE.

Des palpes labiaux d'Anodonte furent fixés, à une température de 15 à 17°, pendant un temps variant entre 15 et 21 heures. Les pièces sont ensuite lavées à l'eau distillée pendant 12 à 24 heures, puis incluses dans la paraffine. Les coupes ont révélé le système nerveux périphérique en noir sur un fond jaune clair à jaune ocre.

Les palpes sont innervés par le nerf tentaculaire, issu du ganglion cérébroïde qu'il quitte à son angle antéro-ventral derrière la commissure cérébro-pédieuse. Ce nerf se dirige vers le palpe où il se divise en deux branches qui innervent les lames externe et interne de l'organe. Chaque branche forme un réseau sous-épithélial à mailles (fig. 1 et 2) qui est en rapport avec des amas de cellules sensorielles épithéliales (fig. 3), avec des formations vasculaires (fig. 4) et avec le réseau de la lame opposée au moyen de cellules connectrices (fig. 5).

La fixation-coloration n'est pas spécifique, mais l'interprétation des images est assez aisée. La morphologie des cellules nerveuses permet de les distinguer facilement des cellules san-

guines et des cellules d'excrétion qui réagissent également au colorant. Les fibres nerveuses montrent une coloration axoplasmique noire qui tranche sur le fond jaunâtre; on peut les suivre, tracées très finement, jusqu'entre les cellules épithéliales banales.

La technique a été utilisée aussi avec succès sur des Annélides Naididés et a révélé la présence d'un cordon nerveux latéral (fig. 6) en rapport avec des fibres transversales innervant les muscles et les soies (fig. 7). Son application à d'autres Invertébrés, notamment des Insectes, est en cours (fig. 8).

SUMMARY.

MAILLET's osmium-zinciodide technique gave the most interesting results and demonstrated the presence of amyelinated fibers in Vertebrates. This method therefore was tried for Invertebrates, including the Mollusca, where it proved fully efficient.

BIBLIOGRAPHIE.

- CHAMPY, Ch. (1918). — Granules et substances réduisant l'iodure d'osmium. *J. Anat. et Physiol.*, **4**, 323.
- CRUZ, A.R. (1962). — Histochemical significance of the osmiumiodide method for autonomic nerves. *Acta Anat.*, **49**, 232-245.
- DEMAL, J. (1955). — Essai d'histologie comparée des organes chémorécepteurs des Gastéropodes. *Mém. Acad. Belg. Cl. Sci.*, **29** (1), 1-88.
- JABONERO, V., FABRA, L., MOYA, J.Y. & JABONERO, Ra.-Ma. (1961). — Resultados del método ácido osmico-yoduro de cinc para la demostración de los elementos periféricos. *Trab. Inst. Cajal. Invest. biol. Exp.*, **43**, 123-171.
- MAILLET, M. (1959). — Modification de la technique de Champy au tétraoxyde d'osmium-iodure de potassium. Résultat de son application à l'étude des fibres nerveuses. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **153**, 939-940.
- MAILLET, M. (1962). — La technique de Champy à l'osmium-iodure de potassium et la modification de Maillet à l'osmium-iodure de zinc. Etude critique. *Trab. Inst. Cajal. Invest. biol. Exp.*, **54**, 1-36.
- MAILLET, M. (1963). — Le réactif au tétraoxyde d'osmium-iodure de zinc. *Z. f. mikr.-anat. Forschung Dtsch.*, **70** (4), 397-425.
- STACH, W. (1961). — Morphologische Beziehungen zwischen Mastzellen und vegetativer Endformation. *Z. f. mikr.-anat. Forschung Dtsch.*, **68**, 257-281.
- STOCKINGER, L. und GRAF, J. (1965). — Elektronenmikroskopische Analyse der Osmium-Zinkjodid Methode. *Mikroskopie, Wien.*, **20**, (1-2), 16-35.