



HAL
open science

**LE TUBE DIGESTIF D'OPHIOTHRIX QUINQUEMA
CUL A TA (Délie Chiaje) ÉTUDE HISTOLOGIQUE
MISE AU POINT TECHNIQUE**

Pierre Roubaud

► **To cite this version:**

Pierre Roubaud. LE TUBE DIGESTIF D'OPHIOTHRIX QUINQUEMA CUL A TA (Délie Chiaje) ÉTUDE HISTOLOGIQUE MISE AU POINT TECHNIQUE. Vie et Milieu , 1965, pp.757-798. hal-02940631

HAL Id: hal-02940631

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02940631v1>

Submitted on 16 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

758

LE TUBE DIGESTIF
D'*OPHIOTHRIX QUINQUEMACULATA* (Delle Chiaje)
ÉTUDE HISTOLOGIQUE
MISE AU POINT TECHNIQUE

par Pierre ROUBAUD

SOMMAIRE

L'auteur étudie la mise au point de plusieurs techniques de fixation et de décalcification des Ophiures. Il se penche plus particulièrement sur les techniques de fixation du tube digestif d'*Ophiothrix quinquemaculata* (Delle Chiaje).

INTRODUCTION

Le groupe des Echinodermes a suscité, depuis longtemps, des travaux de caractère systématique, morphologique, écologique ou embryologique. Par contre, les données histologiques, éparses et incomplètes, sont d'autant plus fragmentaires que le matériel offre un accès technique difficile.

* Je remercie vivement Monsieur le Professeur DELAMARE DEBOUTTEVILLE qui a encouragé mes débuts dans l'étude des Echinodermes.

J'adresse toute ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs PETIT et PRENANT pour l'accueil qu'ils m'ont réservé dans leurs laboratoires respectifs et les conseils qu'ils m'ont prodigués.

J'exprime ma gratitude à M^{lle} BOBIN qui a guidé et conseillé mon travail. Je remercie les personnels du laboratoire Arago et du laboratoire d'Anatomie Comparée, pour l'aide matérielle précieuse qu'ils m'ont apportée.

En effet, les Echinodermes opposent a priori et à des degrés variables certaines barrières aux investigations de l'histologie usuelle :

— Le liquide coelomique maintient en place les organes naturellement mous, de structure fragile, et presque dépourvus de tissus d'emballage ou de soutien; son écoulement, lors des dissections provoque des déformations et affaissements gênants.

— Les prélèvements d'organes sont aisés pour les espèces de taille appréciable : oursins, holothuries, astéries; mais, pour les ophiures et les comatules, on sait que le disque est petit et fortement calcifié; les viscères, comprimées dans des espaces restreints, se prolongent souvent à l'intérieur des bras et ne peuvent guère être manipulés sans lésions graves.

— Le squelette calcifié fait souvent obstacle à une étude complète en limitant l'éventail des techniques utilisables. Les procédés classiques de décalcification par les acides ont cependant permis, dans bien des cas, de respecter l'anatomie et la morphologie, et de préserver en gros les structures. Il reste que les bouleversements mécaniques et chimiques imposés par ces méthodes rendent précaires les résultats histologiques et interdisent l'emploi d'un grand nombre de recettes indispensables aux recherches cytologiques et histochimiques.

— Enfin, il s'est avéré que les organes prélevés, même sans appliquer une décalcification, sont en général mal conservés par les liquides fixateurs classiques; l'épithélium digestif, très délicat, en souffre au maximum. Cet inconvénient semble dû à l'extrême fragilité de la trame protéique des tissus.

M'étant intéressé, sur les conseils de Monsieur le Professeur DELAMARE DEBOUTTEVILLE, à l'écologie d'une ophiure méditerranéenne : *Ophiothrix quinquemaculata* (Delle Chiaje), j'ai entrepris par la suite l'étude histologique du tube digestif de cette espèce au Laboratoire Arago de Banyuls-sur-Mer et au Laboratoire d'Anatomie et Histologie Comparées de la Faculté des Sciences de Paris où j'ai pu mener ce travail, sous le contrôle de Mademoiselle BOBIN.

Je me suis heurté d'emblée à l'ensemble des difficultés énoncées plus haut et me suis efforcé de les résoudre une à une. Les problèmes majeurs sont centrés autour du mode de fixation et de la composition des liquides fixateurs classiques dont l'action conduit à des images inhabituelles et de mauvaise qualité. Divers tâtonnements m'ont amené à modifier et adapter le degré de concentration des agents fixateurs et la durée de leur contact avec les pièces.

Ce mémoire comprendra d'abord l'exposé des résultats histologiques valables et pour la plupart nouveaux, obtenus par ces méthodes adaptées, à propos du tube digestif.

La deuxième partie sera consacrée à l'analyse des protocoles expérimentaux techniques et leur discussion d'après les aspects révélés par les procédés courants et les procédés adaptés.

Les conclusions seront étayées par la comparaison des images obtenues par différents procédés de fixation classiques avec celles que révèlent les fixations adaptées sur *Ophiothrix quinquemaculata* et sur d'autres échinodermes : ophiures, oursin, holothurie, astérie, crinoïde.

De plus, je compte insister sur l'emploi d'un chélateur décalcifiant utilisé dans des conditions qui, mises au point par CHEVANCE (1961), permettent d'aborder la cytologie et l'histochimie.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les *Ophiothrix quinquemaculata* (Delle Chiaje) ont été récoltées, au cours de séjours au Laboratoire Arago (Banyuls-sur-Mer), au large du Canet. Les chalutages, opérés sur terrain vaseux, par 50 à 100 mètres de fond, sont riches à profusion d'individus jeunes et adultes.

Des échantillons furent élevés dans les bacs du Laboratoire Arago, d'autres maintenus en bon état dans l'aquarium marin, au Laboratoire de Paris, après transport en sacs de polyéthylène.

Les espèces, également méditerranéennes et destinées aux tests comparatifs sont : Echinides : *Paracentrotus lividus* (Lamarck); Crinoïdes : *Antedon mediterranea* (Lamarck); Holothurides : *Stichopus regalis* (Cuvier); Astérides : *Astropecten irregularis* (Delle Chiaje); Ophiurides : *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard), *Ophiura texturata* (Lamarck), *Ophioderma longicauda* (Retzius).

Fixation

Les problèmes soulevés par la fixation devant être discutés plus loin, il suffit d'indiquer ici les procédés responsables des meilleurs résultats :

La fixation dans tous les cas est pratiquée par injection. Les mélanges fixateurs sont employés, soit, selon leur formule normale, soit, sous une forme plus concentrée. Par exemple :

Bouin-Hollande enrichi en acide picrique	} 10 jours et plus
Bouin-Duboscq-Brasil	
Formol neutre à 33 % et plus dans l'eau de mer	
Carnoy	4 h
Helly enrichi à 50 % de formol neutre	6 h
Champy enrichi à 4 % d'acide osmique	48 h

Décalcification

Avec les fixateurs acides dérivés du Bouin, la décalcification s'achève avant la fixation.

Pour les autres catégories de fixateurs, la décalcification a été opérée soit au cours de la fixation, soit après elle, dans une solution neutralisée d'éthylène-diamine-tétracétique (EDTA Na₂). La solution, neutralisée au carbonate de sodium, est tamponnée à pH 7 par du véronal sodique-acide chlorhydrique (tampon de Michaélis).

Une solution neutralisée et tamponnée d'EDTA à 10 % dans le formol, fournit un mélange à la fois fixateur et décalcifiant.

Pour les fixateurs chromiques ou osmiques, type Helly ou Champy, employés seuls, on décalcifie après lavage rapide à l'eau dans une solution neutre d'EDTA à 10 % dans le formol à 10 % ou 40 %.

Traitements ultérieurs

Déshydratation et inclusion banales.

L'alcool a été utilisé et, surtout pour la morphologie, la double inclusion colloïdine-paraffine selon Peterfi. Les coupes à 3 ou 6 μ ont été effectuées sur l'organe prélevé, ou mieux, sur le disque entier pour préserver les rapports entre les organes.

Colorations histologiques générales

Trichrome de Prenant; hématoxyline lente-éosine-orange G; hématoxyline de Groat-picro-indigo-carmin; glychémalun de Mayer ou hémalun de Masson (sans virage à l'eau après fixation osmiée) picro-indigo-carmin; variante adaptée de l'Azan de Heidenhain.

Colorations histochimiques

Acide desoxyribonucléique : réaction nucléale de Feulgen-Rosenbeck (après le Bouin-Hollande enrichi, les meilleurs résultats s'obtiennent avec une hydrolyse de 15 min.).

Acides ribonucléiques : Bleu de toluidine tamponné à pH 4,6, gallo-cyanine, réaction de Mann Dominici; des témoins ont subi l'hydrolyse chlorhydrique de Vendrely.

Lipides osmiophiles : fixation au Champy enrichi et observation directe sur coupe à la paraffine.

Mucopolysaccharides : fixation au Bouin, Bouin-Hollande enrichi, Carnoy, Helly, formol neutre, acide osmique 4 %. Coloration suivant Hotchkiss - Mac Manus et Lillie-Greco. Acétylation réversible suivant Mac Manus - Cason.

Ces réactions de groupe ont été complétées par les techniques suivantes :

— *pour les mucines* : Mucicarmin selon Masson, Bleu Alcian d'après Steedman, colorations métachromatiques d'après Lison selon Sylven et selon Kramer et Windram; Fuchsine paraldehyde selon Gabe. Les colorations à la gallo-cyanine et au bleu de toluidine tamponné utilisées par ailleurs ont confirmé les résultats.

— *pour le glycogène* : coloration au Schiff selon Bauer, au Carmin de Best; contrôle par digestion salivaire.

— *protéines* : réaction de Salazar.

— *phosphatases alcalines* : injection par l'alcool à 95° glacée. Fixation durée : 12 h. Dissection, inclusion à la paraffine 54° : 2 h. Incu-

bation à 37° ou à froid indifféremment et suite des opérations suivant la technique de Gomori-Takamatsu. Contrôle par destruction de l'enzyme à la chaleur et par témoin sans substrat. Contrôle par la recherche du fer suivant Tirmann et Schmeltzer après la réaction de Gomori (procédé Arvy et Gabe).

— *fer* : fixation au Bouin, au formol tamponné neutre. Réaction au bleu de Prusse pour le fer ionique ferrique, au bleu Turnbull pour le fer ionique ferreux, réaction de Tirmann et Schmeltzer pour le fer ionique total, réaction au bleu de Prusse-bleu de Turnbull précédé de démasquage à l'alcool nitrique pour le fer démasquable, coloration de fond : safranine-alcool picrique.

PREMIÈRE PARTIE

HISTOLOGIE ET HISTOCHIMIE

DU TUBE DIGESTIF D'*OPHIOTHRIX QUINQUEMACULATA*

Le tube digestif des Ophiures est de structure simple; c'est, d'après les auteurs, un vaste sac, dit intestin ou estomac, gonflé en dix poches situées dans le disque, entre les bourses génitales. Exceptionnellement (*Ophiocanops fugiens*), cinq de ces poches pénètrent profondément dans les bras, formant de véritables caecums brachiaux analogues à ceux des Astéries (MORTENSEN, 1932).

Il n'y a pas d'anus. La bouche, ventrale et fortement enfoncée au sein de la garniture dentaire, s'ouvre au centre d'une membrane péristomienne. La cavité péristomienne, le plus souvent simple, se prolonge parfois (HAMANN, 1889) par une deuxième cavité plus interne, bordant un court œsophage qui relie la bouche à l'intestin.

D'après les données classiques, on sait que la paroi du tube digestif comprend cinq couches. Ce sont, de la lumière à la périphérie : un épithélium à plateau strié dont la hauteur décroît de la face dorsale à la face ventrale de l'animal, une zone nerveuse plus développée au niveau du court œsophage, une mince assise conjonctive, une couche de muscles circulaires, un épithélium cœlo-mique cuboidal et flagellé.

La morphologie et l'histologie de l'appareil digestif des Ophiures ont suscité peu de travaux. Les descriptions se réfèrent aux notions classiques tirées des études d'ensemble de LYMAN (1882), APOSTOLIDÈS (1881), CUÉNOT (1888-1891), HAMANN (1889), GISLÉN (1924), MORTENSEN (1932) et d'autres. Ces données sont d'ailleurs résumées par HYMAN (1956). Il apparaît, d'après les conclusions de ces auteurs, que le tube digestif des Ophiures est assez schématique

dans sa forme comme dans sa structure. L'épithélium digestif est très uniforme, sans différenciations locales appréciables. A part le plateau strié, le cytoplasme réticulé et les noyaux, personne ne signale de portions glandulaires caractérisées, d'inclusions déterminées, ni de catégories cellulaires distinctes.

Une pareille uniformité semblait *a priori* douteuse. C'est pourquoi j'ai repris la question en appliquant les techniques actuelles de l'histologie et de l'histo chimie.

J'ajoute, d'ailleurs, que les procédés mis en œuvre peuvent paraître incomplets, mais qu'ils sont tributaires des possibilités offertes par l'action des 6 mélanges fixateurs dont j'ai achevé la mise au point à ce jour.

Une lacune subsiste quant à la mise en évidence des éléments mitochondriaux et golgiens. L'étude est en cours.

I. — ENSEMBLE DU TUBE DIGESTIF (fig. 1)

Le disque des Ophiures possède une symétrie rayonnée marquée par les cinq bras (radius). Les cinq espaces interradiaires (interradius) renflés en poches à la maturité sexuelle, contiennent les bourses respiratoires portant les gonades.

Les schémas de la figure 1, dessinés à partir de coupes sériées dans le disque entier (1 cm de diamètre) d'individus de taille moyenne, représentent des sections pratiquées dans des plans perpendiculaires (schémas de gauche, A à D) et parallèles (schémas de droite 1 à 4) à l'axe de symétrie 5 de l'animal. On peut établir une correspondance poussée entre les deux séries de coupes, réalisées bien entendu sur des individus différents. Il suffit de se référer aux 16 intersections des quatre plans horizontaux avec les quatre plans verticaux des schémas placés respectivement à droite et à gauche.

Par exemple, l'intersection du plan horizontal *a* avec le plan vertical 1 se retrouve aussi bien sur le schéma A (en *a*, 1) que sur le schéma 1 (en 1, *a*). A gauche, à partir du schéma *a* qui illustre une section horizontale, nettement ventrale à la bouche, les schémas B, C et D sont de plus en plus dorsaux.

Le schéma A, horizontal, servira de référence pour l'analyse des plans de coupe indiqués sur les autres schémas.

Le schéma vertical 1, dont la trace sur A est marquée *a*, 1 est perpendiculaire à un plan interradiaire au niveau d'une poche interradiaire; il recoupe obliquement un bras de chaque côté de cette poche. Sur les schémas 2, 3 et 4, seule la moitié gauche des coupes verticales est représentée.

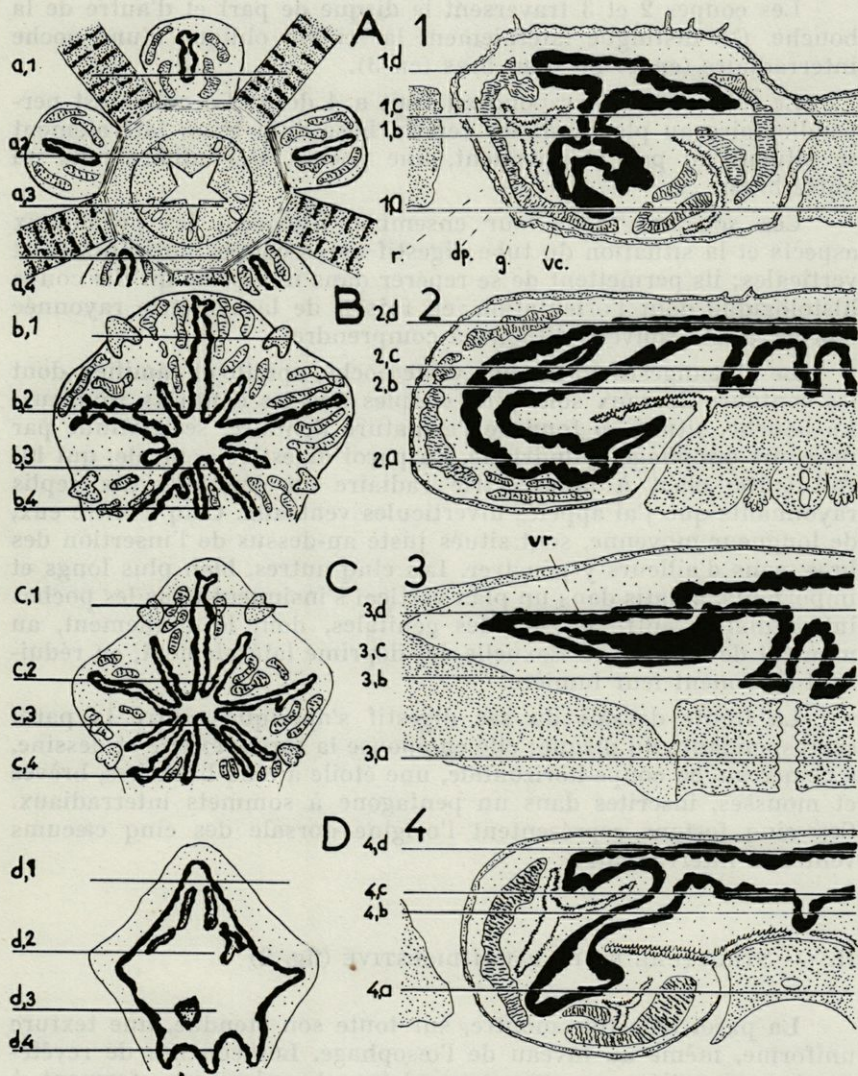


FIG. 1. — Morphologie du tube digestif d'après des coupes sériées. A gauche : 4 coupes horizontales du disque. A : coupe ventrale, B et C : coupes moyennes, D : coupe dorsale.

A droite : 4 coupes verticales du disque. 1 : coupe passant par la base d'un bras; 2 et 3 : coupes passant de part et d'autre de la bouche; 4 : coupe passant par la base d'un bras.

d : sac dorsal; g : gonade; r : bourse respiratoire; vi : diverticule inter-radiaire; vr : diverticule radiaire.

Pour l'explication des lignes de rappel (désignées par a, 1, 1, d...) se reporter au texte.

Les coupes 2 et 3 traversent le disque de part et d'autre de la bouche. On distingue latéralement la section oblique d'une poche interradiaire (en 2) ou d'un bras (en 3).

Le schéma 4, correspond au trait a, 4 de A. La coupe est perpendiculaire au plan radiaire vers la base d'un bras; latéralement se situent un peu obliquement, une poche interradiaire puis un autre bras.

Ces schémas, dans leur ensemble, illustrent les principaux aspects et la situation du tube digestif après coupes horizontales et verticales; ils permettent de se repérer dans n'importe quelle coupe histologique dont l'orientation, en raison de la symétrie rayonnée d'ordre 5, est souvent difficile à comprendre.

Le tube digestif forme une vaste poche, aplatie et ramifiée, dont les contours dorsaux sont plus simples que les contours ventraux. La bouche, située au fond de l'armature dentaire, se continue par un court œsophage cylindrique. La paroi digestive ventrale, qui lui fait suite, obéit à la symétrie radiaire en émettant dix replis rayonnants que j'ai appelés diverticules ventraux. Cinq d'entre eux, de longueur moyenne, sont situés juste au-dessus de l'insertion des bras, sans d'ailleurs y pénétrer. Les cinq autres, bien plus longs et importants, aplatis dans un plan vertical s'insinuent dans les poches interradiaires entre les glandes génitales, dont le gonflement, au moment de la maturité sexuelle, les déprime latéralement, en réduisant fortement leur lumière.

La limite dorsale du sac digestif s'applique contre la paroi correspondante du disque; elle en épouse la forme exacte et dessine, à ce niveau, en coupe horizontale, une étoile à cinq branches, brèves et mousses, inscrites dans un pentagone à sommets interradiaux. Ces cinq festons représentent l'origine dorsale des cinq cæcums ventraux interradiaux.

II. — STRUCTURE DE LA PAROI DIGESTIVE (fig. 2)

La paroi digestive montre, sur toute son étendue, une texture uniforme, même au niveau de l'œsophage. Les couches de revêtement conjonctivo-nerveuse, musculaire et cœlomique, forment à elles trois un mince emballage dont l'épaisseur totale est à peine d'une dizaine de μ et atteint très rarement 30 μ ; il peut arriver que les couches cœlomique et musculaire s'amincissent en une membrane de 1 μ d'épaisseur.

L'épithélium digestif repose sur une basale peu contournée; contrairement aux descriptions classiques chez les Ophiures, il ne présente pas d'amincissement progressif dorso-ventral; son épais-

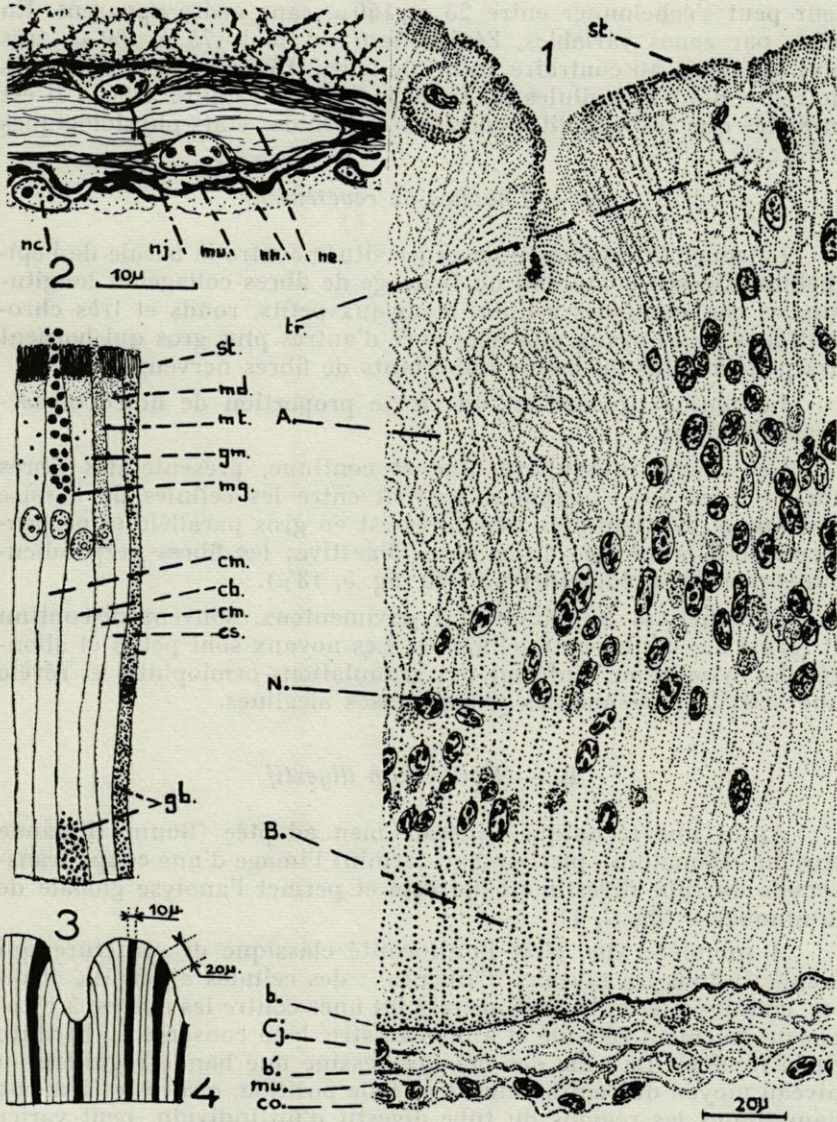


FIG. 2. — Structure de la paroi digestive. 1 : coupe de la paroi digestive (Bouin-Hollande enrichi - Hémalaun picro-indigo-carmin). 2 : couches de revêtement (Bouin-Hollande enrichi - azan). 3 : schéma des rapports entre les types cellulaires de l'épithélium digestif. 4 : schéma expliquant l'élargissement apical des cellules épithéliales.

A : zone apicale; B : zone basale; b et b' : membrane basale; cb : cellule à granulations basophiles (gb); cm : cellule à mucus; cj : couche conjonctive et nerveuse; co : assise coelomique; cs : cellule à plateau strié; gm : gouttelettes muqueuses; md : mucus diffus; mg : mucus en gouttes; mt : mucus en trainée; Mu : couche musculaire; nc : noyau de cellule coelomique; Ne : paquet nerveux; mn : noyau de cellule nerveuse; nj : noyau de cellule conjonctive; St : plateau strié; tr : coelomocyte.

seur peut s'échelonner entre 25 et 150 μ , sans ordre apparent. En effet, par zones variables, l'épithélium est plat (75 à 100 μ), très plat (25 μ) ou, au contraire, muni de lobes (150 μ de haut) encadrés de replis dont les cellules du fond peuvent se réduire à 30 μ . Il est probable que ces inégalités correspondent à des états physiologiques différents.

A. — Couches de revêtement

La couche conjonctivo-nerveuse située contre la basale de l'épithélium digestif comprend un feutrage de fibres collagènes longitudinales contenant des cellules à noyaux petits, ronds et très chromatiques. Ces noyaux alternent avec d'autres plus gros qui bordent des paquets plus ou moins importants de fibres nerveuses.

Le conjonctif contient une forte proportion de mucopolysaccharides diffus.

La couche musculaire, fine et continue, présente des fibres enchevêtrées qui s'insinuent souvent entre les cellules de l'assise cœlomique. L'orientation des fibres est en gros parallèle et perpendiculaire à la surface de la paroi digestive; les fibres perpendiculaires peuvent prédominer parfois (fig. 5, 13 μ).

L'épithélium cœlomique est pavimenteux, souvent discontinu et formé de cellules mal délimitées. Les noyaux sont petits et allongés. Le cytoplasme renferme des granulations osmiophiles et révèle une activité moyenne des phosphatases alcalines.

B. — Epithélium digestif

Après une technique générale bien adaptée (Bouin Hollande enrichi - Hémalum - picro-indigo-carmin) l'image d'une coupe transversale du tube digestif est correcte et permet l'analyse globale de la muqueuse (fig. 2, 1).

A première vue, c'est l'uniformité classique de structure qui frappe (à tous les niveaux d'ailleurs) : des cellules allongées, étroites, élargies à leur sommet, serrées les unes contre les autres, à cytoplasme finement réticulé et à plateau strié bien conservé en bordure de la lumière. La zone des noyaux dessine une bande régulière au niveau moyen de l'épithélium. Une telle position, qui reste la même dans toutes les régions du tube digestif d'un individu, peut varier d'un spécimen à l'autre, ce qui traduit sans doute, ajouté à d'autres facteurs, un certain état fonctionnel. Les multiples plissements de l'épithélium conditionnent la forme des cellules : chacune est en moyenne deux fois plus étroite à la base qu'au sommet (fig. 2, 4). Grosso modo, et, pour la commodité de l'exposé, on peut distinguer trois zones parallèles à la bordure de l'épithélium : une zone apicale

s'étendant du plateau strié aux noyaux, une zone moléculaire et une zone basale.

Quelle que soit la hauteur de l'épithélium (de 30 à 150 μ selon les régions), la zone apicale varie peu d'épaisseur (20 à 30 μ), elle est d'ailleurs partagée en deux bandes : la supérieure mince et chromophile, l'inférieure large et chromophobe.

La zone nucléaire offre un certain nombre de noyaux plus basaux que les autres, plus petits, plus colorés et plus ronds.

La zone basale répond à elle seule des variations d'épaisseur de l'épithélium : fortement réduite chez certains individus, au point de disparaître au-dessous des replis épithéliaux, elle est développée chez d'autres et représente alors partout, à elle seule, plus de la moitié de la hauteur des cellules.

De plus, il faut noter la présence, à différents niveaux de la zone apicale, d'éléments migrants provenant du cœlome.

Un examen plus attentif a révélé trois types cellulaires, reconnaissables, moins par leur morphologie que par les affinités tinctoriales et les réactions histochimiques de leur contenu : ce sont les cellules fondamentales à plateau strié, les cellules à granulations basophiles et les cellules à mucus, que l'on va décrire en détail, ainsi que les cellules migratrices, étrangères à l'épithélium sensu stricto.

a) *Cellules fondamentales à plateau strié* (fig. 2, 3, 4)

Le plateau strié semble former sur toute la surface épithéliale un revêtement continu d'une épaisseur constante de 10 μ . En réalité il garnit la majorité des cellules, mais s'interrompt de place en place, aux points d'affleurement des cellules muqueuses qui, elles, en sont dépourvues. Le plateau strié d'une cellule compte, en coupe, 5 à 6 microvillosités surmontant le bord bombé de la cellule. La touffe ainsi formée s'évase vers la lumière et s'accole par ses bords aux touffes voisines; d'où l'illusion de la continuité. Vers la base au contraire les interstices sont visibles.

Sur certaines coupes bien orientées (fig. 3, 1, 3) apparaissent des grains sidérophiles, sortes d'épaississements locaux de la membrane cellulaire, particulièrement nets aux angles, que HAMANN interprète comme des bases de flagelles; en fait, il ne s'agit pas de restes ciliaires mais probablement d'une structure analogue à ce que les auteurs décrivent dans l'épithélium intestinal des vertébrés sous les noms de « bandelette obturante » (CHÈVREMENT, 1960), « cadre péri- ou épicyellulaire » (BOUIN, 1929; DUBREUIL et BAUDRIMONT, 1959), ou de « terminal bar » des auteurs anglo-saxons (BAILEY, 1953; NONIDÉZ et WINDLE, 1949, par ex.) (fig. 3, 5).

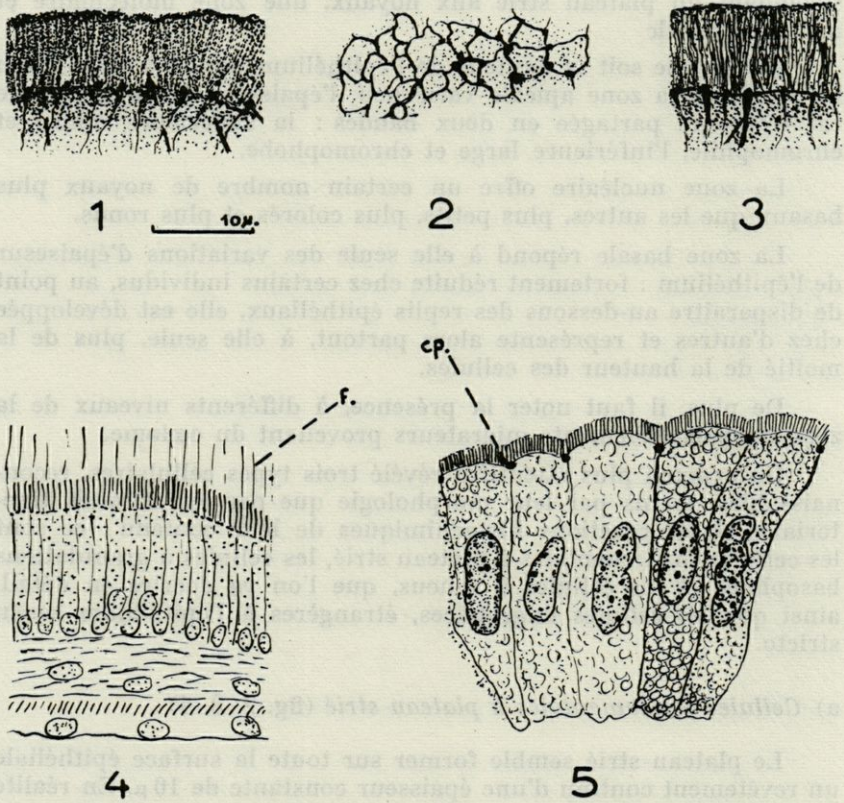


FIG. 3. — Plateau strié (coupes du tube digestif parallèles au plateau strié sauf en 2). 1 : Bouin-Hollande enrichi (Hémalun picro-indigo-carmin). 2 : Coupe rasante superficielle (Bouin-Hollande enrichi, Hématoxyline-éosine-orange G). 3 : Bouin-Hollande enrichi, Hématoxyline-éosine-orange G. 4 : Section de l'intestin d'une ophiure montrant les flagelles d'après Hamann 1889. 5 : Intestin grêle d'homme d'après Bouin 1929. cp : cadre péricellulaire; F : flagelle.

Le plateau strié est sensible au bleu de l'azan, au vert lumière, et fait contraste avec le cytoplasme sous-jacent qui prend l'orange G et l'éosine. Les réactions positives de la fuchsine paraldéhyde et de l'APS mettent en évidence une richesse en mucopolysaccharides. Le bleu Alcian, le mucicarmin et les réactions métachromatiques (Azur I, bleu de toluidine) colorent des mucines abondantes, particulièrement en surface. Si le glycogène est absent de ce plateau, on y décèle, par contre, une forte activité des phosphatases alcalines.

Le cytoplasme de la cellule à plateau strié est assez dense et finement granuleux vers l'apex, puis clair et légèrement alvéolaire jusqu'au noyau, réticulé enfin vers la région basale, au niveau de laquelle les membranes cellulaires sont très nettes.

Les mucopolysaccharides sont localisés dans la zone apicale d'abord en traces diffusés sous le plateau strié, et plus profondément en fines gouttelettes individualisées. Des éléments ergastoplasmiques ténus sont situés dans la même région ainsi que dans la zone basale, presque toujours tassés contre les membranes cellulaires. Des particules lipidiques occupent parfois la zone apicale moyenne; quant à la zone basale elle peut être bourrée de lipides osmiophiles en gouttelettes enclavées dans des alvéoles cytoplasmiques.

Les phosphatases alcalines existent en bordure de la zone apicale et vers la base où elles bordent des lacunes renfermant les lipides.

Les noyaux sont riches en chromatines et pourvus d'un gros nucléole réfringent. Quelques-uns des noyaux situés au-dessus de la région nucléaire normale, présentent des aspects pycnotiques liés à une dégénérescence.

b) *Cellules à plateau strié et à granulations basophiles* (fig. 4)

Les colorants nucléaires comme l'hématoxyline, l'azocarmin G, la safranine — mais non l'hémalun de Masson — révèlent des cellules dont la base, et plus rarement le cytoplasme tout entier jusqu'à la zone apicale, est chargée de granules basophiles réfringents, qui résistent aux tests des mucopolysaccharides (PAS) et à ceux des protides (réaction de Salazar), mais s'imprègnent fortement à la fuchsine paraldéhyde après oxydation (selon Gomori).

Le cytoplasme est plus dense que celui des cellules à plateau strié voisines; le noyau, en position plus basale, est arrondi, plus petit, plus chromophile.

Les granulations basophiles supranucléaires sont en général peu nombreuses et dispersées, et, lorsqu'elles manquent totalement, rien ne permet de distinguer la zone apicale de la cellule de la portion correspondante d'une cellule fondamentale à plateau strié. Vers la lumière, la cellule ne semble pas s'ouvrir à l'extérieur ni pouvoir libérer ses granulations basophiles; cependant un échantillon fixé au formol neutre salé présentait, au-dessus du plateau strié des replis épithéliaux, un revêtement régulier de granules intensément teintés par l'azocarmin G, légèrement colorables en bleu vert par le pico-indigo-carmin, mais réfractaires à l'hématoxyline, à la réaction APS ou à la réaction de Salazar; ces granules, non sidérophiles, semblent pourtant en rapport avec les cellules basophiles, mais il est difficile de préciser si leur présence dans la lumière est ou non accidentelle. Il n'est pas exclu, d'autre part, qu'un contact avec le liquide de la cavité digestive ait pu modifier *in situ* leurs affinités tinctoriales.

Une différenciation très poussée de l'Azocarmin G permet de colorer sélectivement les granulations basophiles, et par conséquent

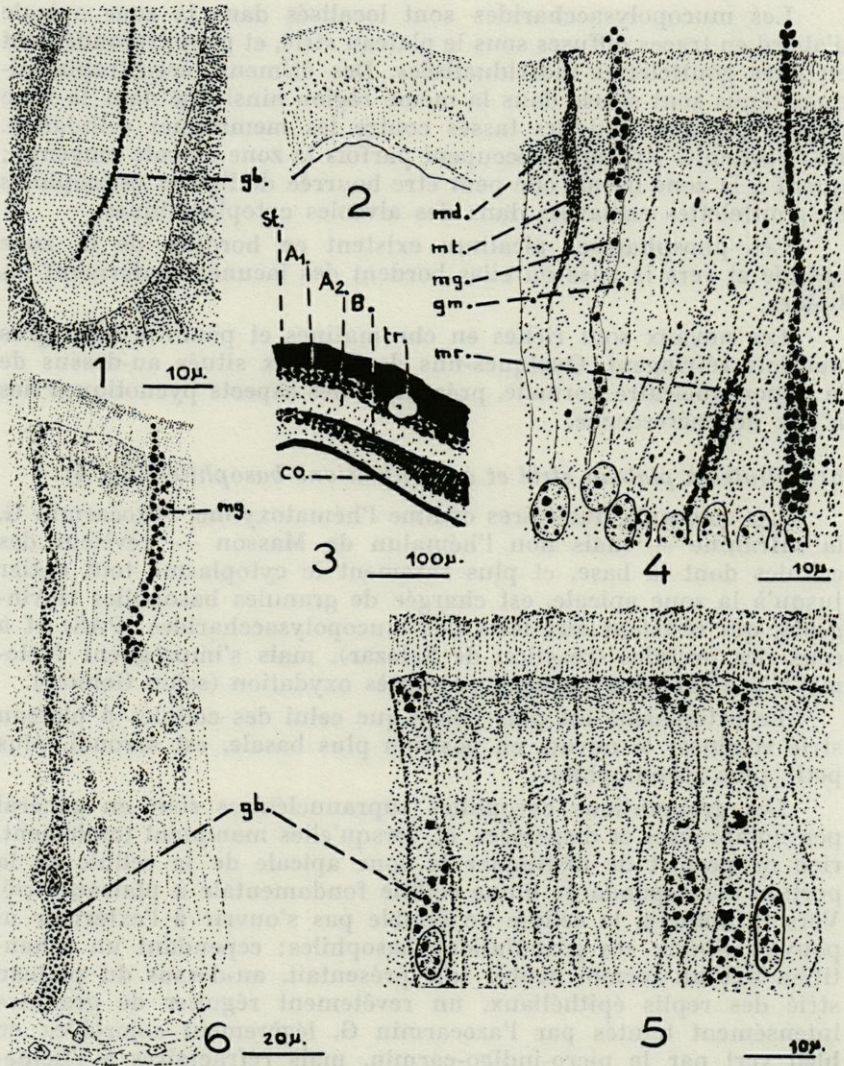


FIG. 4. Types cellulaires de l'épithélium digestif et quelques réactions histo-chimiques. 1 : Grains basophiles dans la lumière (formol, azan). 2 : Témoïn d'une réaction de mise en évidence des phosphatases alcalines. 3 : Phosphatases alcalines (alcool 95°, technique de Gomori-Takamatsu). 4 : Partie supérieure des cellules à mucus (Bouin-Hollande enrichi, APS, hématoxyline-picric-indigo-carmin). 5 : Partie supérieure des cellules à granulations basophiles (Bouin-Hollande enrichi, hématoxyline-éosine-orange G). 6 : Cellules à granulations basophiles et à mucus (Bouin-Hollande enrichi, fuchsine paraldéhyde après oxydation). A1 : bande chromatophile de la zone apicale; A2 : bande chromatophobe de la zone apicale; B : zone basale de l'épithélium; co : assise coelomique; gb : granulation basophile; gm : gouttelette muqueuse; mg : mucus en gouttes; md : mucus diffus; mr : mucus en réseau; mt : mucus en traînée.

de dénombrer aisément les cellules qui les renferment (fig. 7, 5 et 7, 6). La fuchsine paraldéhyde offre aussi de bons contrastes mais est moins spécifique puisqu'elle révèle en même temps les cellules à mucus.

c) *Cellules à mucus* (fig. 4)

Les cellules à mucus ne se distinguent des cellules à plateau strié que par leur zone apicale où le cytoplasme dense renferme des sécrétions muqueuses importantes d'aspect varié : gouttes empilées, traînées diffuses occupant la largeur de la cellule, flaques irrégulières accolées à la paroi.

Elles sont dépourvues de plateau strié et, à l'inverse des granulations basophiles, les sécrétions muqueuses s'écoulent directement dans la lumière.

En réduisant le temps d'action des colorations métachromatiques de Sylven et de Kramer et Windrum, on colore exclusivement les mucus; les cellules à mucus apparaissent alors en bleu sur fond incolore et sont faciles à dénombrer.

d) *Coelomocytes* (fig. 5)

Des cellules amibocytaires semblables aux granulocytes et « tréphocytes » décrits par LIEBMAN (1950) dans le liquide coelomique d'*Arbacia* (Echinides), pénètrent dans la paroi digestive; elle s'accumulent et se multiplient activement au sein de la zone apicale de l'épithélium (fig. 5, 7 à 13). Les phases de la migration sont concrétisées par des images de coelomocyte en train de franchir la basale de l'assise digestive et de cheminer dans la zone inférieure de celle-ci.

Sous le plateau strié, un certain nombre de coelomocytes dégénèrent, phénomène que LIEBMAN a sommairement décrit *in vitro* et dans les tissus normaux de *Arbacia*. Chez *Ophiothrix quinquemaculata* le cytoplasme se charge de granulations denses, souvent réfringentes et acidophiles, parfois basophiles et légèrement muqueuses, tandis que le noyau perd sa structure; puis le cytoplasme se condense en une grosse boule détachée de la membrane et le noyau se désintègre. Enfin, la boule cytoplasmique est résolue en gouttes de taille de plus en plus petite qui renferment parfois encore des grains résiduels positifs après la réaction de Feulgen.

De nombreuses gouttelettes s'accumulent contre le plateau strié et finissent par disparaître (fig. 5 - 11, 12).

Un mode de dégénérescence beaucoup plus fréquent permet à l'amœbocyte entier d'être libéré dans la lumière digestive : le cytoplasme s'éclaircit d'abord, puis le noyau devient compact, se déforme et entre en pycnose. Des mucus diffus entourent extérieurement

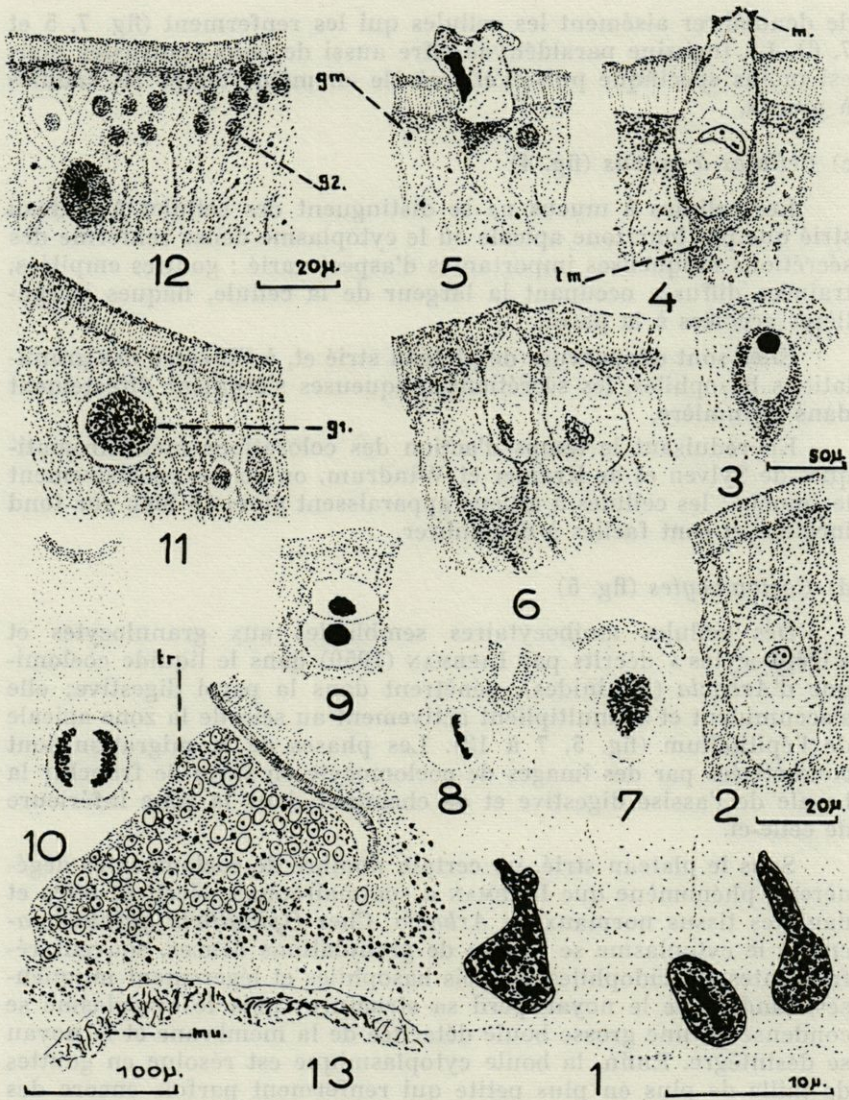


FIG. 5. — Coelomocytes dans la paroi digestive. 1 : Figure de pénétration (Helly nerichi, Feulgen). 2, 3, 4, 5 : Migration et dégénérescence d'un coelomocyte (Bouin-Hollande enrichi, et dans l'ordre, azan, bleu de toluidine tamponné, azan, APS-hématoxyline-picro-indigo-carmin). 6 : Groupe isogénique de coelomocytes (Bouin-Hollande enrichi, trichrome de Prenant). 7, 8, 9, 10 : Figures de division (Bouin-Hollande enrichi, Feulgen). 11, 12 : Dégénérescence intra-épithéliale (Bouin-hollande enrichi, hématoxyline-éosine-orange G). 13 : Accumulation de coelomocytes (Bouin-hollande enrichi, hématoxyline-éosine-orange G). g1, g2 : gouttes cytoplasmiques libérées par la dégénérescence intra-épithéliale; gm : gouttelette muqueuse; mu : couche musculaire; tm : trainée muqueuse accompagnant le coelomocyte; tr : coelomocyte.

ment l'amoebocyte en un croissant qui accompagne la cellule dans sa progression jusqu'au plateau strié qu'elle traverse en se déformant (fig. 5 - 3, 4 et 5). Avant la chute de la cellule le cytoplasme forme une colonne à sommet évasé et dentelé couverte d'un mince film muqueux et faisant saillie au-dessus du plateau strié. Le noyau est tassé contre la membrane et le croissant est utilisé au colmatage de la déchirure laissée par le passage de la cellule.

Souvent la zone apicale de l'épithélium digestif voisin des gonades est envahie par un si grand nombre d'amoebocytes que sa structure normale devient méconnaissable (fig. 5 - 13).

III. — CONCLUSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Les notions classiques relatives au tube digestif des Ophiures reposaient jusqu'ici sur des études morphologiques et histologiques assez sommaires. La structure fondamentale de cet organe était connue dans ses grandes lignes et les auteurs distinguaient dans sa paroi : l'épithélium digestif à plateau strié et hautes cellules flagellées (voir fig. 3, 4, d'après CUÉNOT, 1889), des couches d'emballage conjonctive, nerveuse et musculaire et enfin un épithélium coelomique cuboïdal cilié.

En adaptant des techniques de fixation aux tissus fragiles des Ophiures et en appliquant les méthodes histochimiques actuelles, encore jamais tentées sur ce matériel, j'ai pu obtenir, pour le tube digestif d'*Ophiothrix quinquemaculata*, de larges compléments d'information et des images plus claires et nouvelles.

Après avoir précisé la morphologie des diverticules digestifs, leur situation et leurs rapports, j'ai insisté sur la disposition et l'aspect des couches de revêtement et porté mon effort principal sur l'épithélium digestif. Je ne rappellerai ici que les résultats essentiels.

A. — Tissus de revêtement

Sur quelques points, les couches de revêtement du tube digestif d'*Ophiothrix quinquemaculata* diffèrent des descriptions classiques; en effet, les couches conjonctive et nerveuse ne sont pas distinctes, mais les paquets nerveux sont enveloppés dans une lame conjonctive continue; la couche musculaire n'est pas faite de fibres circulaires, mais d'éléments enchevêtrés en tous sens et qui paraissent pénétrer dans l'épithélium coelomique en traversant sa basale. L'épithélium coelomique semble dépourvu de ciliature et affecte un type pavimenteux non cuboïdal; les limites cellulaires sont d'ailleurs peu distinctes. L'histochimie m'a permis de localiser des mucus

diffus dans la zone conjonctive, une activité phosphatasique intense dans la couche coelomique, qui se montre souvent aussi chargée de lipides.

B. — *Épithélium digestif*

J'ai retrouvé, bien entendu, avec les techniques courantes, l'aspect classique, uniforme et monotone de cet épithélium à plateau strié, formé de hautes cellules réticulées, d'aspect vide le plus souvent (fig. 2, 1). Seule l'histochimie m'a permis, en plus des cellules à plateau strié fondamentales, de déceler deux autres types cellulaires passés inaperçus, et que j'ai pu caractériser seulement par les propriétés d'un de leurs pôles : apical pour les cellules à mucus, basal pour les cellules à granulations basophiles.

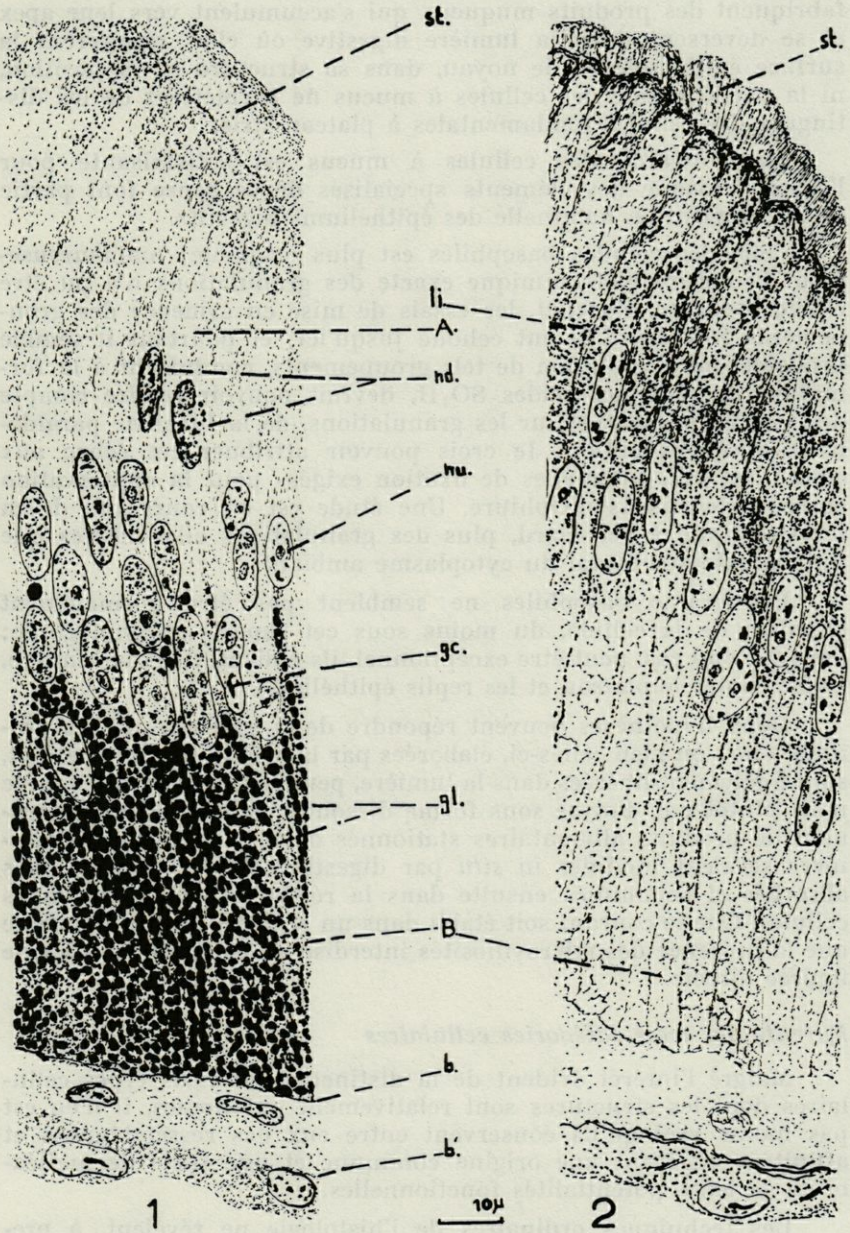
Je rappellerai rapidement les caractéristiques des trois types cellulaires et dirai quelques mots sur les coelomocytes intégrés dans l'épithélium.

Les cellules à plateau strié (fig. 2, 3 : cs) constituent l'élément banal et fondamental de l'épithélium digestif. Les microvillosités du plateau, d'une épaisseur constante chez les animaux frais, sont riches en mucines et phosphatases alcalines. Ces cellules, minces et allongées renferment un noyau ovoïde et chromophile qui les partage en deux régions.

La région apicale, faite de cytoplasme dense, est garnie de gouttelettes muqueuse (md) et parfois de fines inclusions lipidiques. Directement sous le plateau se situe le siège d'une forte activité des phosphatases alcalines liée évidemment à celle des microvillosités voisines; ailleurs existent des substances muqueuses diffuses. La région basale se caractérise par un cytoplasme clair dépourvu de mucus, mais souvent chargé en totalité de gouttes graisseuses; l'activité des phosphatases alcalines y semble très moyenne.

Les cellules à granulations basophiles (fig. 2,3, cb) possèdent, comme les précédentes, un plateau strié, mais leur noyau, petit et arrondi, est basal; le cytoplasme dense contient des grains réfringents, à forte affinité pour les colorants basiques et la fuchsine paraldéhyde (cb) mais réfractaires aux tests des mucopolysaccharides; fréquemment localisés dans la zone inférieure de la cellule, les grains basophiles peuvent dans certains cas la remplir complètement.

FIG. 6. — Lipides osmiophiles (Champy enrichi 48 h., Feulgen). 1 : Épithélium à réserves lipidiques. 2 : Épithélium à lipides en voie d'assimilation. A : zone apicale; B : zone basale; b et b' : membranes basales; gc : grain de chromatine; gl : gouttelette lipidique; li : lipide en voie d'assimilation; nd : noyau en dégénérescence; nu : nucléole; st : plateau strié.



Les cellules à mucus (fig. 2, 3, cm) privées de plateau strié, fabriquent des produits muqueux qui s'accumulent vers leur apex et se déversent dans la lumière digestive où elles recouvrent la surface épithéliale. Ni le noyau, dans sa structure et sa position, ni la partie basale des cellules à mucus ne permettent de les distinguer des cellules fondamentales à plateau strié.

La trouvaille des cellules à mucus est satisfaisante pour l'esprit, puisque des éléments spécialisés de ce genre font partie de la composition habituelle des épithéliums digestifs.

Celle des cellules basophiles est plus originale; malheureusement la nature histochimique exacte des granulations n'a pu être élucidée encore. En effet, les essais de mise en évidence des groupements S-O ou -SS- ont échoué jusqu'ici; et pourtant il semble probable que l'oxydation de tels groupements, conduisant à la formation de radicaux acides SO_4H , devrait pouvoir rendre compte de la réaction positive sur les granulations, de la fuchsine paraldéhyde après oxydation. Je crois pouvoir attribuer cet échec aux conditions exceptionnelles de fixation exigées pour la conservation correcte des tissus d'Ophiure. Une étude est en cours qui devra tenir compte, à cet égard, plus des granulations elles-mêmes que du contexte structural du cytoplasme ambiant.

Les grains basophiles ne semblent pas être normalement expulsés de la cellule, du moins sous cet aspect morphologique; dans un seul cas, peut-être exceptionnel, ils étaient, dans la lumière, collés contre le plateau et les replis épithéliaux.

Deux hypothèses peuvent répondre de la présence de ces granulations : ou bien celles-ci, élaborées par la cellule qui les contient, sont finalement libérées dans la lumière, peut-être sous forme figurée mais plutôt par dialyse sous forme dissoute, ou bien elles proviennent de produits alimentaires stationnés dans la lumière; ces derniers seraient modifiés *in situ* par digestion extra-cellulaire, puis absorbés et accumulés ensuite dans la région basale de certaines cellules. Que le courant soit établi dans un sens ou l'autre, il semble que la présence des microvillosités interdise un échange sous forme figurée directe.

Parenté des trois catégories cellulaires

Malgré l'intérêt évident de la distinction de trois types cellulaires dont les structures sont relativement autonomes, il n'en est pas moins vrai qu'ils conservent entre eux des ressemblances et affinités suggérant une origine commune et une sorte de malléabilité de leurs potentialités fonctionnelles.

Les techniques ordinaires de l'histologie ne révèlent, à première vue, qu'une catégorie cellulaire dite à plateau strié; celle-ci

demeure, après application de méthodes spécialisées, le type fondamental le plus répandu, qui recèle en puissance certaines caractéristiques des deux autres types.

Les points communs sont : la taille, la forme générale étirée, l'aspect du réseau protoplasmique et, semble-t-il, une accumulation périodique et basale de gouttes lipidiques.

A part l'absence (ou la perte) du plateau strié, les cellules à mucus semblent être les dérivés les plus directs des cellules à plateau strié; ces dernières renferment, en effet, en même position, des mucopolysaccharides diffus ou dispersés; on pourrait interpréter ceux-ci comme une phase préliminaire des grosses granulations concentrées et de même nature garnissant les vraies cellules sécrétrices de mucus. Les cellules fondamentales d'ailleurs, avec leurs ribonucléines plus abondantes, leurs lipides apicaux et leurs phosphatases peuvent être des lieux actifs de présynthèse de divers corps.

Les cellules à granulations basophiles, tout en conservant le plateau strié des éléments fondamentaux, se singulariseraient davantage; la place et la texture de leur noyau est, en général, différente et elles élaborent ou absorbent un produit particulier, encore mal défini, qui peut envahir tout le cytoplasme ou se localiser dans la région basale; dans ce dernier cas, des mucopolysaccharides sont détectables vers l'apex.

Ces quelques constatations mènent à envisager qu'un type cellulaire unique est à l'origine des spécialisations enregistrées. On peut supposer qu'une réversibilité est possible et que les images observées sont liées plus à des étapes fonctionnelles qu'à des catégories vraiment tranchées.

Pour résoudre ce problème, il faudra, soit étudier la genèse du tissu digestif chez les jeunes, soit dépister chez l'adulte les points privilégiés de renouvellement et croissance cellulaires.

Etats fonctionnels de l'épithélium digestif (fig. 7)

L'observation des coupes de plusieurs dizaines d'individus permet de définir deux états fonctionnels principaux de l'épithélium digestif.

Dans un premier état (fig. 7 à gauche), l'épithélium est bas, riche en cellules muqueuses, pauvre en cellules à grains basophiles. Dans un deuxième état (fig. 7 à droite), l'épithélium est haut, pauvre en cellules muqueuses, riche en cellules à grains basophiles.

Les différences de hauteur ne sont pas dues à la région apicale, qui reste assez constante, mais à une variation d'épaisseur de la région basale infra-nucléaire.

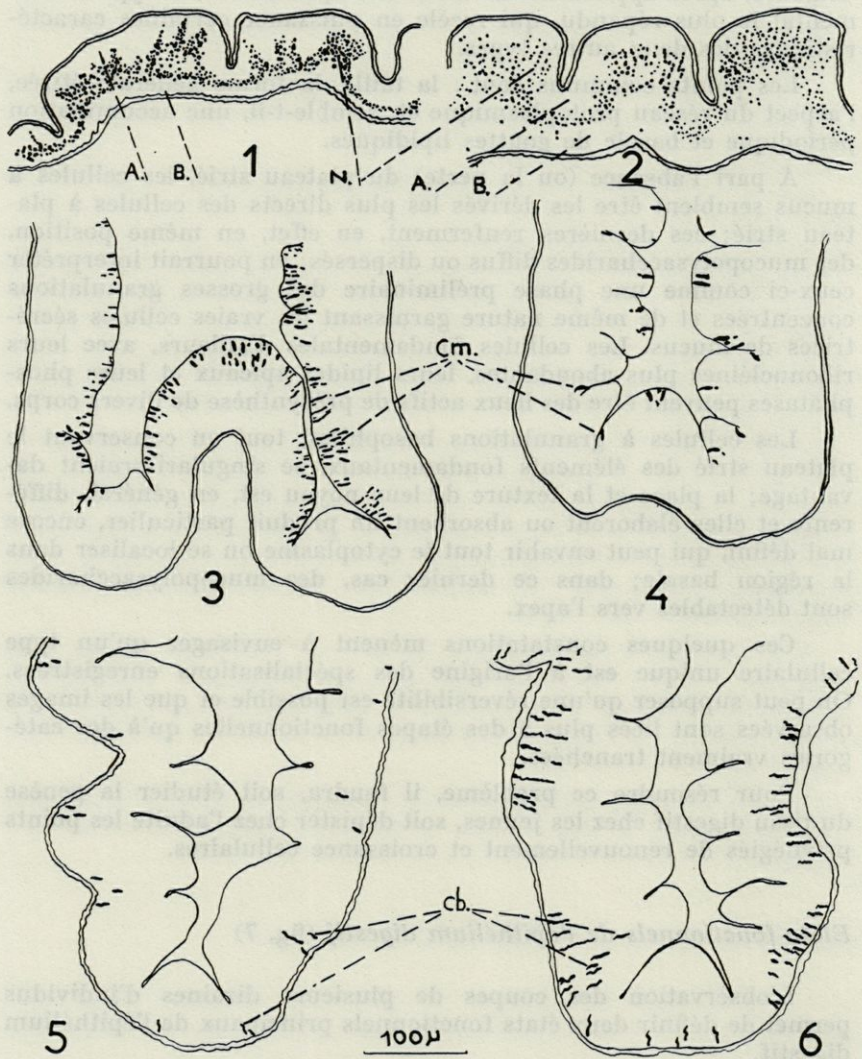


FIG. 7. — Etats fonctionnels de l'épithélium digestif. Deux aspects différents (à gauche : 1, 3, 5 et à droite : 2, 4, 6). 1, 2 : Position des noyaux (Bouin-Hollande enrichi, hématoxyline-éosine-orange G). 3, 4 : Cellules à mucus (Bouin-Hollande enrichi, coloration à l'azur I, temps réduits). 5, 6 : Cellules à granulations basophiles (Bouin-Hollande enrichi, azocarmin G, fortement différencié). A : zone apicale; B : zone basale; cb : cellule à granulations basophiles; cm : cellule à mucus; N : zone des noyaux.

Dans ces conditions, la zone apicale assurerait l'assimilation des substances ingérées et leur transport vers la partie inférieure où elles seraient stockées, puis redistribuées selon les besoins. Un exemple en est donné par la teneur variable en lipides de cette zone suivant les individus (fig. 6).

Les deux états fonctionnels opposés sont matérialisés sur la figure 7 à gauche et à droite, par la position des noyaux (1-2), la quantité des cellules à mucus (3-4) et celle des cellules à granulations basophiles (5-6).

Le balancement quantitatif des cellules à mucus et des cellules basophiles lié à une certaine hauteur épithéliale semble significatif. On peut penser que la profusion des cellules muqueuses d'une paroi basse correspond à l'ingestion récente d'un repas et que l'autre aspect se raccorde à l'assimilation proprement dite.

Coelomocytes infiltrés

Il est fréquent que des tubes digestifs d'invertébrés et, parmi eux, des Echinodermes, assument en annexe de leur fonction principale, un certain rôle dans l'excrétion souvent par simple accumulation de déchets *in situ*. L'interprétation exacte de certains groupes d'inclusions est de ce fait hasardeuse. Sans pouvoir rien préciser dans ce sens, je veux attirer l'attention sur une autre voie possible de drainage dévolue peut-être aux cellules amibocytaires infiltrées dans l'épithélium, donc étrangères à lui.

Ces amibocytes sont connus chez les Echinodermes dans des zones privilégiées où ils s'accumulent : paroi digestive, voisinage immédiat des glandes génitales, etc...

LIEBMAN (1950) les nomme « tréphocytes » et leur attribue chez les oursins un rôle trophique des cellules génitales femelles. Selon cet auteur, les jeunes ovules s'accroîtraient aux dépens de tréphocytes absorbés par phagocytose. Cette interprétation paraît assez surprenante; il n'est pas exclu que le phénomène soit inversé et que les coelomocytes en question ingèrent eux-mêmes par phagocytose les déchets issus des gonades ou de leur dégénérescence locale.

En fait, chez *Ophiothrix quinquemaculata*, j'ai observé aussi bien chez les mâles que les femelles des amoebocytes accumulés contre certaines régions des gonades, mais n'ai pas encore poussé l'investigation. Au niveau du tube digestif, j'ai observé l'infiltration à travers la basale d'amoebocytes qui gagnent finalement la zone apicale des cellules où ils se multiplient activement. Beaucoup sont chargés de diverses granulations et subissent alors une dégénérescence dont j'ai pu suivre les phases; un premier processus aboutit au morcellement de l'amoebocyte et à l'accumulation des fragments

sous le plateau strié où ils se résolvent et disparaissent. Dans d'autres plus fréquents, l'amœbocyte s'altère dans son noyau comme dans son cytoplasme et est expulsé en totalité dans la lumière digestive (fig. 5).

Les coelomocytes doivent jouer un rôle de drainage, soit au profit d'un organe donné, soit par un système de relai à partir d'autres organes. Il faut noter qu'il peut y avoir accumulation parallèle de coelomocytes dans les gonades et l'épithélium digestif voisin. En tous cas, au cours de leur migration les coelomocytes se chargent visiblement de produits divers qui semblent bien finalement être rejetés dans la lumière digestive ou subir sur place une autolyse.

DEUXIÈME PARTIE

QUELQUES PROBLÈMES TECHNIQUES DE L'HISTOLOGIE DES OPHIURES

Les techniques mentionnées dans la première partie présentent quelques particularités : fixations très prolongées par des solutions concentrées, décalcification à l'aide de l'EDTA (Éthylène-diamine-tétracétique).

L'objet de cette deuxième partie est de justifier ces méthodes, nouvelles pour le groupe des Echinodermes.

On se limitera ici au domaine de l'histologie classique en microscopie optique. Les problèmes touchant à la conservation des structures fines (mitochondries, corps de Golgi) et des ultrastructures feront l'objet d'un travail ultérieur.

Animaux de petite taille, à tissus fragiles limités par un conjonctif peu pénétrable et un important squelette interne calcifié, les Ophiures demandent la mise au point simultanée de méthodes de fixation capables d'atteindre rapidement tous les tissus malgré les divers obstacles, et des procédés de décalcification permettant la réalisation de coupes *in toto* pour l'observation des tissus en place.

Le tube digestif a été choisi pour les raisons suivantes :

- Il est très fragile et les figures obtenues par les techniques usuelles sont mauvaises.
- Le sac digestif revêt la paroi interne du disque sur toute son étendue et sa structure est partout la même; on est

donc certain de retrouver cet organe sur n'importe quelle section traversant le disque; une coupe prise au hasard suffit alors à déterminer la valeur d'un essai.

- Enfin, le sac digestif se détache aisément du squelette lors des dissections : les prélèvements ainsi opérés ont pu servir de témoins pour les essais de décalcification. D'un autre côté, l'*Ophiothrix quinquemaculata*, extrêmement abondante, peut se récolter en lots importants et fournir le matériel indispensable à de multiples essais. Les individus issus de ces lots ont subi les mêmes conditions de vie. J'ai pris soin d'expérimenter sur des spécimens de même taille et de même provenance.

I. — LA FIXATION

A) Historique

Pour la plupart, les auteurs donnent peu de précisions sur les techniques utilisées. CHADWICK (sur *Echinus*, 1900) et BONNET (sur les Echinoides, 1924), par exemple, ne fournissent aucune indication; GUISLAIN (1953) mentionne l'utilisation (sur *Holothuria impatientis*) de fixations bichromatées sans autres commentaires; GÉROULD (sur une Holothurie, 1896), SMITH (sur *Ophiothrix fragilis*, 1940), LIEBMAN (sur un Oursin, 1950), DEFRETIN (sur divers Echinodermes, 1952), ANDERSON (sur une Astérie, 1954), etc., ne donnent pas la durée des fixations.

Les fixateurs employés sont très divers; le plus souvent, ils sont acides pour les nécessités d'une décalcification. Citons le Susa (SMITH, 1937, sur divers Echinodermes dont *Ophiothrix fragilis*), le Flemming (CUÉNOT, 1891, sur divers Echinodermes), le Bouin, dont NARASIMHAMURTI (1933) et OLSEN (1942) écrivent, à dix ans d'intervalle et pour des groupes différents (Ophiures et Astéries) qu'il fournit des « résultats splendides ».

Parmi les liquides non décalcifiants notons l'emploi du Zenker-formol : LIEBMAN (sur un Oursin, 1950), ANDERSON (sur une Astérie, 1953, 1954), du Flemming sans acide acétique : SMITH (sur *Ophiothrix fragilis*, 1940) du Carnoy : DEFRETIN (sur divers Echinodermes, 1952), de l'acide osmique à 2 % : SHAVER (sur des larves d'Oursin, 1954), du Formol : NARASIMHAMURTI (sur *Ophiocomina nigra*, 1933), OLSEN (1942), ANDERSON (1953), de l'acétone : ANDERSON (1953), etc.

Cette brève revue montre que la fixation n'a pas été abordée jusqu'ici comme un problème en soi. Seul KOEHLER écrivait en 1883, dans une thèse sur les Echinides : « Je crois que l'erreur d'HOFF-

MANN tient au mode de préparation qu'il faisait subir à ses pièces pour les recherches histologiques. Il n'employait, en effet, que l'acide chromique ou le bichromate de potasse, lesquels ne peuvent conserver des éléments aussi délicats que ceux de l'épithélium intestinal des oursins. Les pièces destinées à l'étude histologique exigent un traitement préalable à l'acide osmique qui seul permet d'obtenir des préparations convenables ». Une telle remarque ne semble plus nécessaire aujourd'hui : la diversité des fixateurs cités plus haut en témoigne; j'ai pourtant pu montrer que l'obtention d'images intactes et complètes des tissus de l'*Ophiothrix quinquemaculata* et de quelques autres Echinodermes demandait de nombreux tâtonnements.

B) Echec des méthodes usuelles

Plusieurs séries de tests, réalisées dans des conditions variées, au moyen de fixateurs différents, ont montré que la fixation des tissus de l'*Ophiothrix quinquemaculata* demande l'emploi de techniques originales.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Opérations

— Les disques entiers, bras sectionnés, tombent dans un très large excès de fixateur.

— La pièce séjourne dans le fixateur un temps variable : formol neutre à 10 % : un jour à plusieurs semaines; Bouin Duboscq : un jour et deux jours; Helly et Carnoy : 1 h, 2 h, 4 h, 6 h.

— La décalcification est réalisée en 6 à 8 jours par un bain dans une solution neutre d'EDTA à 10 % dans le formol à 10 %.

— Déshydratation à l'alcool butylique, inclusion à la paraffine.

Résultats (fig. 9 - 1)

La continuité de l'épithélium digestif n'est pas respectée, le plateau strié a disparu, les noyaux des cellules sont déplacés; par endroits l'épithélium digestif offre un cytoplasme aux mailles lâches et irrégulières contenant des noyaux épars.

Cette première série d'expériences a été renouvelée deux fois pour éliminer les causes d'erreur.

2^e SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Opérations

Le protocole est le même que précédemment sauf sur les points suivants :

— La fixation a porté sur des fragments du tube digestif prélevés par dissection ou sur des secteurs de disque coupés aux ciseaux. La dissection a été menée dans un milieu varié : eau de mer, eau douce, Cl₂Mg à 5 % dans l'eau de mer, liquide fixateur lui-même.

— En plus des fixateurs cités plus haut, de nouveaux liquides ont été essayés : formol à 10 % salé et neutre, formol à 10 % tamponné à pH 7 au tampon de Michaelis (véronal sodique-HCl), Bouin Hollande et Regaud.

— Pour éliminer les lésions possibles introduites par la décalcification les pièces sont réparties en deux groupes.

1^{er} groupe : traitement à l'EDTA, même s'il ne s'impose pas (par exemple pour les fragments de sac digestif prélevés par dissection).

2^e groupe : pas de décalcification, ce qui nécessite, pour les pièces fixées *in toto*, un prélèvement postérieur à la fixation des tissus non calcifiés.

— Pour préciser l'influence des dégradations mécaniques toujours possibles lors des manipulations, les fragments de sac digestif sont répartis en deux groupes.

1^{er} groupe : double inclusion gélose-paraffine selon Chatton.

2^e groupe : déshydratation à l'alcool butylique et inclusion normale à la paraffine.

Résultats

On observe en gros les mêmes défauts que dans la première série d'expérience, avec tout de même de légers progrès.

— Fixation au Carnoy 3 h et 4 h après dissection : la forme générale des cellules est conservée mais les noyaux sont toujours mal colorables et le cytoplasme plus ou moins lavé.

— Fixation au Bouin Hollande, 2 jours, après dissection : quelques fragments seulement conservent leur plateau strié.

— Fixation au Bouin Hollande et au Carnoy : les résultats les plus mauvais s'obtiennent pour les pièces de grande taille ou pour les fixations les plus courtes.

Les pièces de grande taille se fixant mal, il fallait chercher à diminuer les obstacles à la pénétration et éviter la dilution du fixateur.

Pour les grosses pièces (disques entiers) il devenait nécessaire d'opérer par injections massives du fixateur.

Le Bouin Hollande réussissant mieux que le Bouin ordinaire, le problème du degré de concentration des agents fixateurs se posait.

Enfin, les résultats étant d'autant plus mauvais que les durées étaient plus courtes, la question « temps de fixation » intervenait également.

Mes recherches dans ce sens m'ont conduit aux premiers résultats valables.

C) La fixation par injection

Le disque des Ophiures, par sa structure même, désigne le coelome comme la meilleure voie de pénétration pour un liquide

fixateur : injecté dans le coelome, celui-ci peut gagner rapidement les tissus par les voies naturelles et ménager les plus fragiles tels les feuillets digestifs.

L'inconvénient inévitable sera la disparition ou le déplacement de tous les éléments figurés libres de la cavité générale; ceux-ci toutefois pourront être étudiés par des méthodes de prélèvements localisés.

Après de multiples tentatives, j'ai mis au point, du moins pour *Ophiothrix quinquemaculata*, un procédé efficace qui favorise le

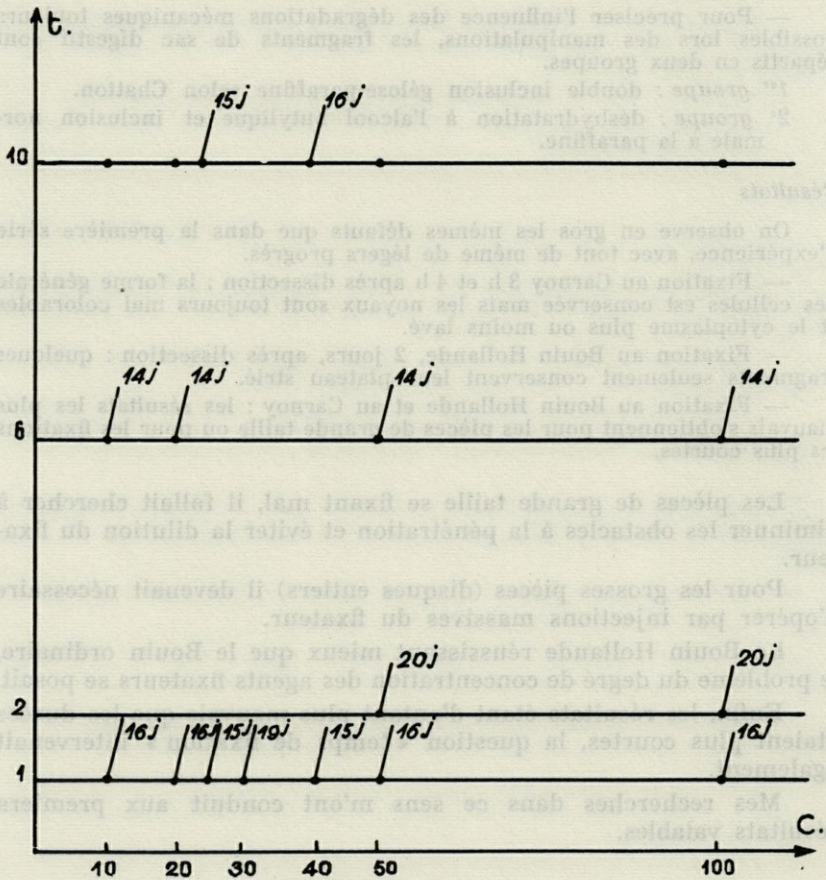


FIG. 8. — Tableau des essais réalisés avec le formol. C : Concentration du fixateur neutre tamponné en formol du commerce (en %). t : Temps de fixation en jours. nj : Durée du traitement décalcifiant à l'EDTA en solution neutre tamponnée à 10 % dans le formol à 10 %. Lorsque la flèche n'est pas marquée, la pièce n'a pas subi de décalcification mais a été prélevée par dissection.

remplacement total et rapide du milieu intérieur par le liquide fixateur.

Il faut se munir d'une seringue à injection contenant 5 cm³ de fixateur. Les bras sont coupés par torsion au niveau de la deuxième vertèbre et l'aiguille est enfoncée entre les boucliers radiaux horizontalement, de l'extérieur vers l'intérieur jusqu'à ce que l'extrémité parvienne au centre du disque.

Le liquide est poussé lentement dans la cavité coelomique, entre le feuillet digestif et la paroi externe du corps. Les poches génitales se gonflent. Le liquide finit par jaillir par les moignons de bras et par l'orifice de la piqûre. On laisse alors l'animal se vider jusqu'à l'affaissement des poches génitales puis on recommence plusieurs fois l'opération.

La fixation par injection dans des disques entiers donne pour le tube digestif des résultats comparables à ceux obtenus sur fragments prélevés par dissection en cours de fixation puis replongés dans le fixateur.

L'injection pratiquée à répétition favorise la pénétration rapide du fixateur et supprime les risques de dilution.

L'emploi sur disques entiers, de la double imprégnation celloïdine-paraffine selon PETERFI, ou de la double inclusion gélose-paraffine selon CHATTON sur des fragments disséqués juste après injection n'améliorent pas la qualité des préparations. Le risque de lésion des tissus se place au moment de la fixation et non dans les opérations ultérieures : les inclusions banales à la paraffine sont donc suffisantes.

La fixation par injections répétées laisse les organes en place et leur évite des dégradations mécaniques. Cette notion trouve sa confirmation dans la régularité des figures obtenues.

D) *Deux paramètres principaux : la concentration et la durée*

1) *La fixation au formol*

Opérations

J'ai résumé par le tableau ci-contre les essais relatifs au formol. En ordonnée, les temps de fixation; en abscisse, la concentration du liquide fixateur en formol commercial. Les flèches indiquent la durée du séjour des pièces dans la solution décalcifiante neutre d'EDTA à 10 % dans le formol à 10 %. L'influence de ce traitement sera envisagée plus loin.

Résultats (fig. 9-1, 2, 3, 4) (Planches IV, V, VI, VII)

Fixation de 10 jours

Formol 10 % (fig. 9-1) : continuité de l'épithélium non respectée, cytoplasme vacuolisé avec plateau strié arraché ou fondu. Noyaux mal conservés, irrégulièrement colorables et souvent déplacés.

Fixation mauvaise

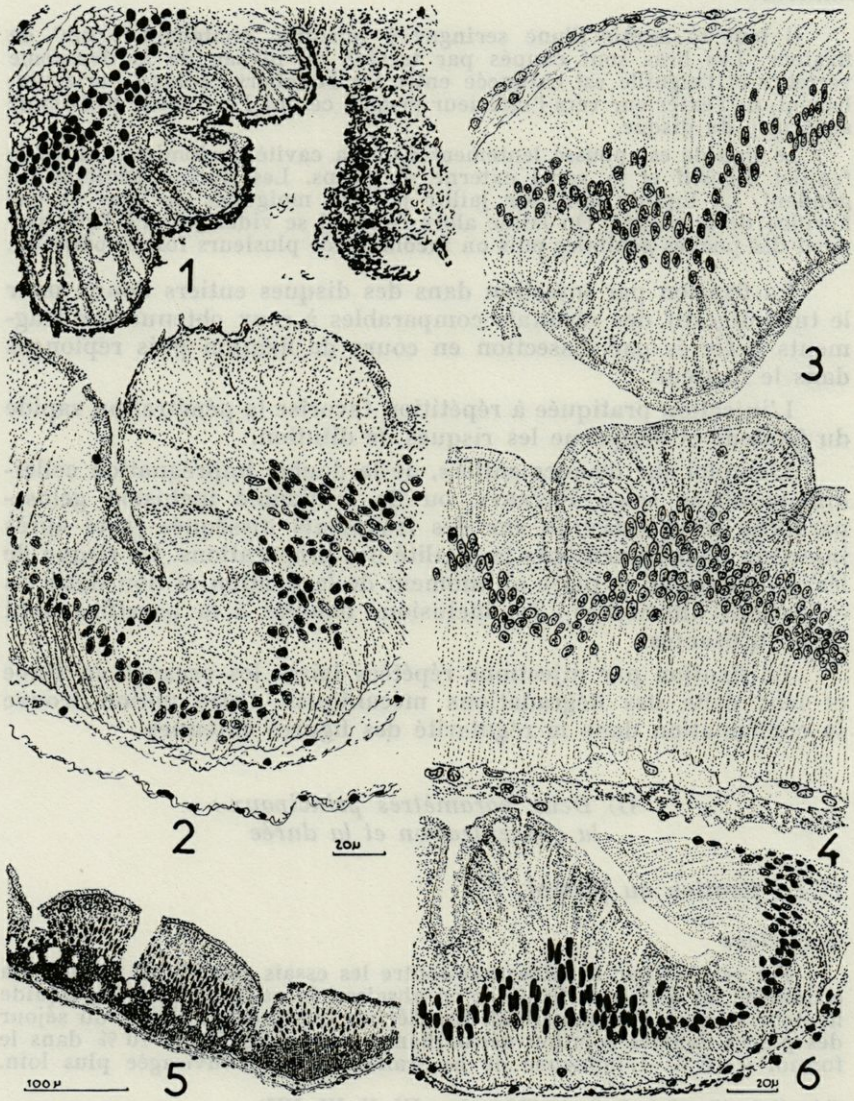


FIG. 9. — Conditions de fixation du tube digestif d'*Ophiothrix quinque-maculata*. 1, 2, 3, 4 : Formol neutre tamponné au tampon Michaelis, 10 jours. 1 : formol 10 % ; 2 : formol 20 % ; 3 : formol 50 % ; 4 : formol commercial pur. 5 : Fixation au Champy enrichi à 4 % d'acide osmique, 24 h. 6 : Fixation au Helly enrichi à 50 % de formol, 6 h.

Formol 20 % (fig. 9-1) : Continuité de l'épithélium respectée par places, cytoplasme bien conservé par endroits ainsi que le plateau strié. De place en place, la partie apicale des cellules est arrachée. On observe des vacuolisations provoquées. Les noyaux sont peu colorables.

Fixation utilisable

Formol 50 % (fig. 9-3) : Continuité de l'épithélium respectée en général. Cytoplasme et plateau strié bien conservés. On observe cependant quelques vacuoles anormales dans la zone des noyaux. Les noyaux sont presque tous colorables avec grains de chromatine et nucléoles ment.

Fixation bonne

Formol pur (fig. 9-4) : Continuité de l'épithélium respectée partout, cytoplasme et plateau strié partout intacts. Noyaux colorables normale-distincts.

Fixation satisfaisante

Fixation de 6 jours

Les résultats sont comparables mais le seuil de la fixation s'est déplacé vers les concentrations plus fortes, ce qui se traduit par une qualité inférieure des pièces fixées au formol à 50 %.

Fixation de 1 jour (Planches VI-A et VIII-A)

On note, en partant du formol à 10 %, la même série de figures allant d'une fixation mauvaise à une fixation acceptable. Avec le formol 33 % on a encore de nombreuses zones vacuolisées dans le cytoplasme. Même avec le formol pur, il y a des irrégularités dans la conservation du cytoplasme; en particulier, dans leur partie apicale, les cellules de l'épithélium digestif sont souvent gonflée ou éclatées, aspect que l'on trouve rarement pour une fixation de 10 jours.

Ainsi, plus le temps de fixation est court et plus le seuil de la fixation se déplace vers les fortes concentrations.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une fixation de 10 jours par une solution neutre de formol commercial pur, tamponnée à pH 7 par le tampon de Michaelis (véronal sodique HCl). Cette fixation a pu être combinée sans dommage avec une décalcification simultanée à l'EDTA.

2) *La fixation au « Bouin »*

Avec le « Bouin Duboscq » les résultats valables exigent une durée de fixation supérieure à deux jours. A mesure que la durée de fixation baisse, les mêmes figures de mauvaise fixation apparaissent et dans le même ordre.

Au « Bouin » ordinaire une fixation de 15 jours est bonne et dix jours suffisent lorsque la fixation se déroule en présence d'un excès d'acide picrique.

Les meilleurs préparations proviennent d'une fixation de 10 jours dans un mélange concentré, modification de la formule du Bouin Hollande : en augmentant fortement la concentration en acétate neutre de cuivre, on peut dissoudre une quantité considérable d'acide picrique. Il faut prendre la précaution de laisser un

large excès d'acide picrique pour éviter la précipitation de sel de cuivre sur la pièce au cours de la fixation.

Même avec un tel « Bouin enrichi », on constate que la diminution des temps fait apparaître les mêmes artefacts qu'avec le formol et dans le même ordre.

3) Fixateurs cytologiques chromés et osmiés

S'il est possible de faire varier dans une certaine proportion la concentration des fixateurs de type Regaud, Helly ou Champy, on ne peut augmenter à volonté la durée de fixation car ces mélanges sont instables et s'altèrent rapidement.

Des injections répétées ne peuvent pallier à cet inconvénient car les tissus deviennent friables et se désagrègent, d'où échec relatif de mes tentatives.

Seules des préparations obtenues par un Helly enrichi à 50 % de formol pendant 6 h (fig. 9, 6 et planche VIII, C) et un Champy enrichi à 4 % d'acide osmique pendant 48 h (fig. 9, 5 et planche VIII, B) ont donné des images utilisables. Il faut remarquer qu'avec le Helly les cytoplasmes sont assez régulièrement conservés, mais les noyaux sont mal colorables. Avec le Champy apparaissent des phénomènes de surfixation liés aux fortes concentrations en acide osmique (surcharge des régions riches en lipides) qui se superposent à quelques artefacts connus introduits par une fixation trop courte. Le plateau strié est irrégulièrement conservé, la partie apicale des cellules est souvent « éclatée », des vacuoles anormales sont visibles dans la zone basale. Mais, à l'inverse des cas précédents (Helly, Regaud), les noyaux sont généralement bien fixés.

Ces constatations suggèrent que les deux facteurs concentration et durée ont, pour les fixateurs osmiés et chromés, le même rôle que pour le formol et le Bouin : seule l'instabilité des mélanges a jusqu'ici empêché de pousser plus loin les expériences.

On verra plus loin qu'on peut tenter d'utiliser l'EDTA comme stabilisateur de certains mélanges fixateurs.

Extension des résultats obtenus

Pour être certain que les propriétés constatées ne sont pas particulières à l'espèce étudiée, j'ai déterminé les conditions de fixation du tube digestif de quelques représentants de diverses classes d'Echinodermes : *Ophiothrix fragilis* (Abildgaard), *Ophiura texturata* (Lamarck), *Ophioderma longicauda* (Retzius) pour les Ophiurides; *Astropecten irregularis* (Delle Chiaje) pour les Astérides; *Stichopus regalis* (Cuvier) pour les Holothurides; *Antedon mediterranea* (Lamarck) pour les Crinoïdes et *Paracentrotus lividus*

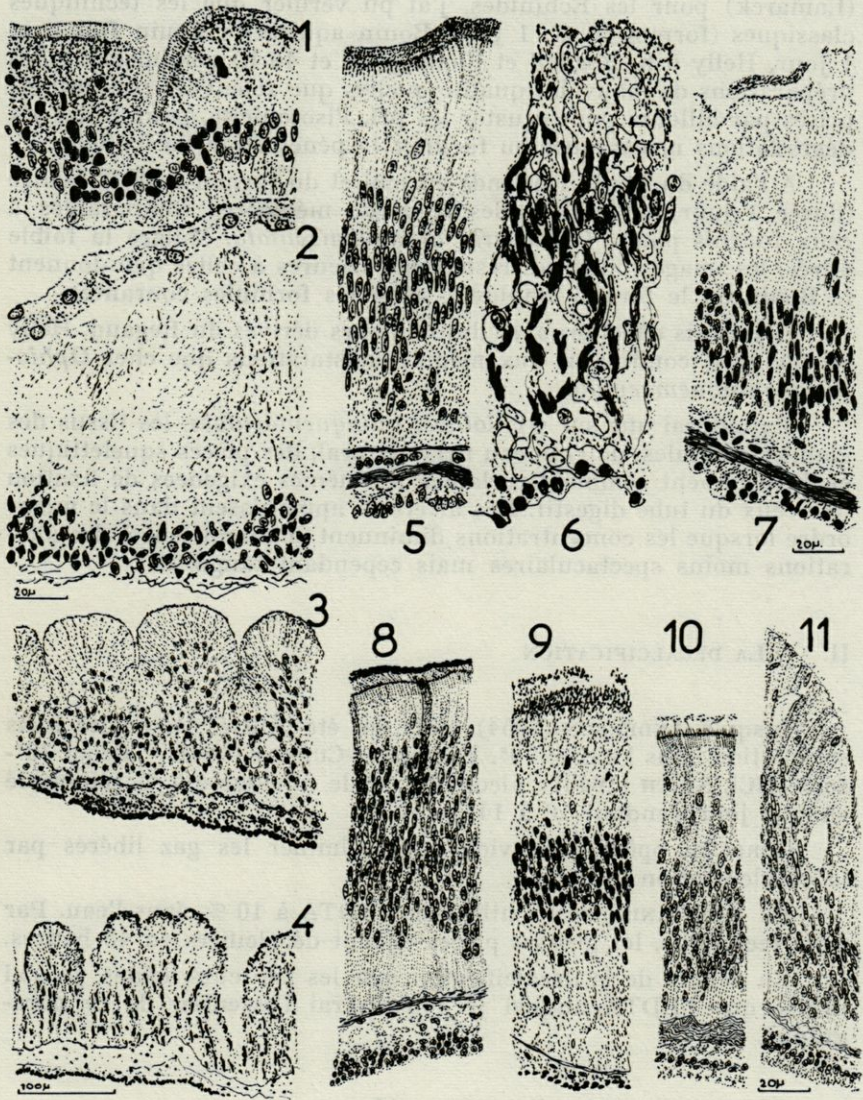


FIG. 10. Conditions de fixation chez quelques Echinodermes. 1, 2 : *Ophi-
thrix fragilis* : formol neutre tamponné, 1 jour. 1 : formol 40 % ; 2 : formol
10 %. 3, 4 : *Paracentrotus lividus*. 3 : Bouin-Hollande enrichi, 1 jour ; 4 : for-
mol 10 % neutre tamponné, 1 jour. 5, 6, 7 : *Ophioderma longicauda*. 5 et 7 :
bon et mauvais aspect d'une fixation au Bouin-Hollande enrichi, 1 jour ; 6 : for-
mol 10 % neutre tamponné, 1 jour. 8, 9, 10, 11 : *Astropecten irregularis*. 8 : Bouin-
Hollande enrichi, 1 jour ; 9 : formol 10 % neutre tamponné, 1 jour ; 10 : formol
40 % neutre tamponné, 1 jour ; 11 : Bouin alcoolique, 1 jour.

(Lamarck) pour les Echinides, j'ai pu vérifier que les techniques classiques (formol 10 %, 1 jour, Bouin aqueux et Bouin Duboscq, 1 jour, Helly 6 h, Regaud et Champy 24 et 48 h) conduisent à des préparations de mauvaise qualité quelles que soient les précautions prises par ailleurs pour ajuster les pH, l'isotonicité, pour éviter les dégradations mécaniques ou faciliter la pénétration du fixateur.

A l'aide du Bouin Hollande enrichi et du formol à 40 % neutre (durée 1 jour) on obtient des résultats médiocres comparables à ceux fournis pour *Ophiothrix quinquemaculata*. Malgré la faible durée, les images obtenues restent supérieures à celles que donnent le Bouin ou le formol employés selon les formules courantes.

Les essais effectués avec des fixateurs dérivés du Regaud, Helly ou Champy, conduisent aux mêmes constatations que chez *Ophiothrix quinquemaculata*.

J'ajouterai que sur *Ophiothrix quinquemaculata*, les tissus des glandes génitales, de l'anneau nerveux oral, des pièces squelettiques et du tégument semblent réclamer les mêmes exigences de fixation que ceux du tube digestif. Des artefacts apparaissent dans le même ordre lorsque les concentrations diminuent et conduisent à des altérations moins spectaculaires mais cependant tangibles.

II. — LA DÉCALCIFICATION

Jusqu'à ANDERSON (1954) seuls ont été utilisés les acides forts en solution dans l'alcool 70°. Exemple : CUÉNOT (1891) : alcool 70°-acide HCl, SMITH (1940) : alcool 70°-acide nitrique à 2 % renouvelé chaque jour pendant 10 à 14 jours.

GÉROULD opère sous vide pour éliminer les gaz libérés par la décalcification.

En 1954, ANDERSON a utilisé de l'EDTA à 10 % dans l'eau. Par cette technique, les grosses pièces étaient décalcifiées en 48 heures.

En dehors de la décalcification par les fixateurs acides, je n'ai utilisé que l'EDTA auquel je consacrerai l'essentiel de ce paragraphe.

Décalcification par les fixateurs acides

Le squelette interne étant formé pour l'essentiel de carbonate de calcium, il est particulièrement sensible à l'action des acides. Les fixateurs contenant de l'acide acétique comme les liquides de Bouin, le Zenker acétique et le Ciaccio permettent une décalcification très brutale qui s'accompagne d'un très fort dégagement gazeux.

La décalcification est terminée en deux à quatre jours, ce qui reste inférieur au temps de fixation minimum correspondant à ces fixateurs.

J'ai obtenu de très bons résultats avec le Bouin Hollande enrichi : la trame du tissu squelettique était bien conservée, en particulier les noyaux, ce que l'on peut expliquer par la grande vitesse de pénétration du fixateur dans le tissu calcifié.

Décalcification par l'EDTA (1)

L'affinité de l'EDTA (Ethylène diamine tétracétique) pour les ions métalliques est régie par les règles de la chélation. Le sel disodique de l'EDTA capte le calcium à pH 7 pour donner un corps chimiquement inerte et soluble. Ces propriétés en font un produit de choix pour les décalcifications.

Dans son « Etude comparative de la décalcification des structures osseuses de la capsule otique et des osselets à l'aide des solutions acides usuelles et d'un chélateur », CHEVANCE montre la très grande supériorité de la décalcification à l'EDTA.

Pour ma part, au moment de justifier l'application de cette technique aux Ophiures, j'ai d'abord pensé comparer ses résultats à ceux obtenus avec les solutions acides usuelles. Mais il est possible de faire mieux. On peut, en effet, en travaillant sur le tube digestif, éviter par la dissection tout traitement décalcifiant. En comparant les résultats obtenus avec ou sans passage dans la solution décalcifiante, on peut vérifier d'une façon rigoureuse si ce traitement introduit des altérations dans les préparations.

Réversibilité de la fixation

Opérations

J'ai utilisé une solution neutre d'EDTA à 10 % dans le formol à 10 %.

Fixation au formol - Répartition des pièces en 2 groupes :

1^{er} groupe : dissection et inclusion sous décalcification de fragments de sac digestif.

2^e groupe : un traitement à l'EDTA précède la dissection.

Résultats

Pour les pièces fixées longuement avec un fixateur concentré, aucune différence entre les groupes.

Pour les pièces fixées un temps court avec un formol relativement faible, le traitement par la solution d'EDTA semble introduire une légère altération.

(1) Je dois remercier L.C. CHEVANCE, qui m'a conseillé l'emploi de l'EDTA dès le début de ce travail et m'a précisé tous les détails nécessaires à son utilisation.

Interprétation

J'ai pensé qu'il y avait là un phénomène de réversibilité de la fixation telle qu'on en a décrit pour une fixation au formol après un lavage prolongé à l'eau.

Fixation décalcifiante au formol

Pour éviter le phénomène de la réversibilité de la fixation, j'ai utilisé la fixation-décalcification, préconisée par CHEVANCE, en fixant, à l'aide d'une solution neutre d'EDTA à 10 % dans le formol à 40 % tamponné à pH 7 par le tampon de Michaelis.

Un deuxième groupe de pièces témoins était fixé par la même solution de formol tamponné, mais sans EDTA.

Il est apparu par ce procédé que le traitement à l'EDTA n'apporte aucune modification décelable dans la structure et la colorabilité des tissus fixés au formol.

Fixation-décalcification par les fixateurs à base d'ions métalliques lourds

CHEVANCE indique que la fixation-décalcification ne peut être réalisée avec des fixateurs neutres contenant des ions métalliques lourds.

« Tous les facteurs aqueux sont susceptibles d'être utilisés comme solvants de l'EDTA, à condition, évidemment, qu'ils ne contiennent pas de métaux lourds qui seraient complexés au même titre que le calcium, ou même préférentiellement, ce qui exclut de cette technique de « fixation-décalcification » de nombreux fixateurs de valeur cytologique renfermant du bichromate de potasse, du sublimé ou de l'acide osmique ».

J'ai pourtant réussi, contrairement à cette opinion de CHEVANCE, à mener à son terme une décalcification dans le temps normal à l'aide d'une solution d'EDTA à 5 % dans le formol à 40 % en présence d'un large excès de bichromate de potassium. La présence du bichromate n'a diminué en rien l'affinité du chélateur pour le calcium.

Une solution neutre de chélateur dans le bichromate de potassium est active sur le carbonate de calcium en poudre, du moins pendant les premières heures.

En même temps, j'ai pu conserver sans qu'elle se trouble la solution dix jours de plus qu'une solution témoin préparée sans l'EDTA. Il ne s'agit pas d'une véritable stabilisation puisque la couleur de la solution change. On peut cependant chercher à uti-

liser cette propriété de l'EDTA pour résoudre le problème de la fixation par les fixateurs à base d'ions métalliques lourds.

Mais en dehors de cette application possible à la fixation proprement dite des tissus de l'Ophiure, il sera nécessaire, dans le domaine de la décalcification, de vérifier sur des tissus plus classiques si la technique de fixation-décalcification à l'EDTA peut s'appliquer lorsque le fixateur contient des ions métalliques lourds. Il est très possible que le chélateur soit resté disponible en présence de bichromate de potassium, dont le chrome est masqué sous la forme de l'ion Cr_2O_7 . Dans un tel cas, la fixation-décalcification n'aurait été ouverte, en fait, qu'à un fixateur comme le Regaud, exempt d'ions métalliques lourds positifs, mais resterait encore fermée à des fixateurs comme le Helly qui contient avec le sublimé des ions métalliques non masqués.

Conclusion de la deuxième partie

Les techniques histologiques ayant presque toujours été élaborées sur les tissus des vertébrés supérieurs, le problème de leur adaptation se pose quand on passe à l'étude des invertébrés. Il s'ensuit des tâtonnements d'autant plus laborieux que l'on dispose de peu d'explications générales des phénomènes de la fixation. Or, fréquemment, les mêmes tissus, sur des espèces même très voisines, présentent des exigences tout à fait opposées et déconcertantes. Dans ces conditions le zoologiste peut se voir obligé de limiter l'éventail de ses techniques et de réduire d'autant la précision et la sûreté de ses descriptions. Un tel cas se présentait avec le tube digestif des Ophiures : les difficultés de la fixation rendaient précaire sinon impossible l'emploi des méthodes histochimiques.

J'ai pu définir les conditions de la fixation au moins dans le cas du formol et des liquides de Bouin :

- injection massive et répétée du fixateur par voie coelomique,
- utilisation de fixateurs concentrés : formol commercial neutre pur, Bouin enrichi,
- prolongation de la fixation au-delà de 10 jours.

Pour les fixateurs cytologiques osmiés et chromés, ces procédés apportent des améliorations de la qualité des préparations mais les résultats plus complexes demeurent insuffisants.

Il reste, en tout état de cause, que le tube digestif des Ophiures se comporte de façon peu ordinaire en présence des liquides fixateurs.

« La fixation », écrit LISON (1960), « consiste à créer des liaisons stables entre les molécules protéiques de façon à consolider

leur disposition spatiale préexistante. Pour les protéines fibrillaires dont la nature est naturellement solide, les besoins de la fixation se font beaucoup moins sentir que pour les protéines globulaires qui jouissent d'une mobilité relativement grande dans la cellule ». Si cette interprétation est exacte, le problème posé par le tube digestif des Ophiures ne peut être expliqué par l'existence d'enzymes doués d'un très grand pouvoir de dégradation des tissus.

De fait, on ne saisit pas comment les enzymes seraient bloqués par les liquides fixateurs concentrés seulement à la longue, mais ne commenceraient pas à jouer leur rôle dès le début de la fixation.

Si l'on exclut ensuite le rôle éventuel d'obstacles dressés devant la pénétration du fixateur (les exigences de la fixation sont les mêmes avec des pièces de petite taille) on en vient à interroger la structure même de l'édifice protéique des tissus du tube digestif de l'Ophiure.

« Il est généralement reconnu », écrit LISON dans son *Traité d'Histochimie* (1960), « que la fixation histologique ne conserve pas les aminoacides libres ni probablement les polypeptides les plus simples, et que les pertes en protéines pendant et après la fixation sont réduites. D'après les expériences de KAUFMANN et ses collaborateurs (1948) et celles de HARTLEIB, DIFFENBACH et SANDRITTER (1956), toutes les deux sur la fixation par le formol et le liquide de Carnoy, les pertes sont très faibles et ne dépassent pas 1 %. Au contraire, les expériences de DULLAM (1957) sur le fixateur de Palade (tétroxyde d'osmium dans un tampon acétate véronal pH 7,3) révèlent un passage appréciable de protéines dans le fixateur : entre 4 et 10 % pour le cœur, entre 9 et 17 % pour le rein. »

Il est permis de penser que la fragilité des tissus d'Echinodermes, particulièrement du tube digestif, réside dans leur forte concentration en protéines à faible poids moléculaire facilement solubilisables.

Le formol et le Carnoy conservent fort bien le cytoplasme des cellules de l'épithélium digestif. Avec le Carnoy cependant les noyaux sont altérés. Au contraire, avec un fixateur osmié, les noyaux étant en général correctement fixés, il est difficile de conserver le cytoplasme.

Ces observations ne peuvent-elles pas être rapprochées (la question de la fixation des noyaux constituant un problème particulier) des études rapportées par Lison sur les pertes en protéines par solubilisation dans le fixateur ?

Une telle hypothèse expliquerait aussi l'importance et la rapidité des phénomènes d'autolyse, la dégradation enzymatique fournissant des composés solubles beaucoup plus rapidement avec les protéines à faible poids moléculaire.

L'objectif premier de mon travail sur la fixation était la mise au point de techniques de fixation valables en histologie classique pour le groupe qui avait retenu mon attention. Par rapport à cet objectif, il me reste encore à adapter les fixateurs à base d'ions métalliques lourds.

Cependant mes résultats m'autorisent maintenant à renverser le problème. Echec et succès peuvent servir à découvrir des particularités des protéines des tissus d'Echinodermes. Au lieu d'envisager la fixation comme un mal technique nécessaire donnant accès à d'autres recherches, il est possible de s'en servir comme d'un moyen d'étude par elle-même.

LISON remarque justement qu'un gros travail reste à faire dans l'étude de la fixation, c'est-à-dire dans l'étude de l'édifice protéique des tissus et des cellules au moyen des fixateurs variés que l'histologie a mis à notre disposition.

Les premiers résultats que j'ai obtenus peuvent fournir à une étude ultérieure d'utiles bases de départ.

RÉSUMÉ

Le tube digestif d'*Ophiothrix quinquemaculata*, étudié grâce à la mise au point des techniques de fixation et de décalcification des Ophiures, révèle, après les colorations histologiques et histo-chimiques actuelles, une structure légèrement différente et surtout plus complexe que ce qui était classiquement admis.

J'ai pu surtout distinguer et décrire trois types cellulaires dans l'épithélium digestif et observer la migration et la dégénérescence, dans la paroi stomacale, d'éléments d'origine coelomique.

Du point de vue technique, le tube digestif d'*Ophiothrix quinquemaculata* exige des fixations de longue durée par des mélanges concentrés mis rapidement au contact des tissus par voie coelomique grâce à une injection massive dont les conditions optima sont définies.

Les méthodes de fixation classiques échouent quelles que soient les précautions prises. L'instabilité des fixateurs osmiés et chromés rend précaire leur adaptation comme fixateurs des Ophiures, mais un stabilisateur a été envisagé, l'éthylène diamine tétracétique neutralisé (EDTA), utilisée par ailleurs dans la décalcification.

Les résultats acquis pour le tube digestif de *Ophiothrix quinquemaculata* ont été sommairement étendus au tube digestif de diverses espèces prises dans toutes les classes d'Echinodermes.

Pour la décalcification, il a été démontré, parallèlement à la valeur des fixateurs dérivés du Bouin, la possibilité d'une fixation-décalcification par l'EDTA en solution dans le formol. Ce traitement n'entraîne aucune altération décelable des tissus.

La fixation-décalcification dans le cas des fixateurs chromés a été démontrée possible par l'EDTA, mais la fixation reste encore fortement défectueuse.

SUMMARY

The digestive system of *Ophiothrix quinquemaculata* studied by perfecting the methods of fixation and decalcification of Ophiurians reveals, after the histological and histo-chemical colorations at present in use, a slightly different and, above all, more complex structure than is usually admitted.

Above all I have been able to distinguish and describe three type of cells in the digestive epithelium and to observe the migration and degeneration, in the stomach wall, of elements originating from the coelom.

From a technical point of view, the alimentary canal of *Ophiothrix quinquemaculata* requires prolonged fixations by means of concentrated mixtures rapidly brought into contact with tissues through the coelom by means of massive injections, the optimum conditions of which we have been able to establish.

Though used with the utmost care, the ordinary processes of fixation fail to work. Osmium and Chrome — fixatives are so unstable that they hardly can be adapted to be used as fixatives with *Ophiothrix quinquemaculata*, but the use of EDTA, already used in decalcification, has been contemplated.

The results obtained with the alimentary canal of *Ophiothrix quinquemaculata* have been roughly extended to the alimentary canal of different species taken among all classes of Equinoderms. In regard to decalcification, besides the value of fixatives derived from Bouin, the possibility of obtaining decalcification-fixation through EDTA in a solution of formol has been demonstrated. Such treatment does not cause any discernible alteration in the tissues. In regard to chrome-fixatives, decalcification-fixation has been shown to be possible by means of EDTA, but the fixation remains as yet extremely defective.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verdauungsapparat von *Ophiothrix quinquemaculata* zeigt, dank neuer Fixierungs- und Entkalkungsmethoden einen etwas verschiedenen und viel komplizierteren Aufbau als man bisher annahm.

Es werden drei verschiedenen Zelltypen im Verdauungsepithelium unterschieden und beschrieben. Die Wanderung und der Rückgang von zoelomischen Elementen in der Magenwand konnte beobachtet werden.

Die klassischen Fixierungsmethoden führen nicht zum Ziel. Osmium oder Chromverbindungen können, wegen ihrer Labilität, nur beschränkt verwendet werden. Die Verwendung von neutralisiertem EDTA als Stabilisator hat sich als günstig erwiesen. Dieser Stoff wird auch zur Entkalkung verwendet.

Die bei *Ophiothrix quinquemaculata* erzielten Ergebnisse wurden mit verschiedenen anderen Stachelhäuten verglichen.

Die EDTA-Formol Lösung als Entkalkung und Fixierungsmittel wurde mit den klassischen Bouin Verbindungen verglichen. Es wurden keinerlei sichtbare Gewebsschädigungen beobachtet.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, J.M., 1953. Structure and function in the pyloric caeca of *Asterias*. *Biol. Bull.*, **105**: 47-61, pl. I-III.
- ANDERSON, J.M., 1954. Studies on the cardiac stomach of *Asterias*. *Biol. Bull.*, **107**: 157-173, 3 figs, 1 pl.
- BAILEY, SMITH, COPENHAVER, 1953. Bailey's textbook of Histology. Baillière, Tindall and Cox, ed., 775 p. Voir p. 61.
- BONNET, 1924. Sur l'appareil digestif et absorbant de quelques Echinides réguliers. *C.R. Ac. Sc.*, **179**: 846-848.
- BOUIN, 1929. *Eléments d'Histologie*. Lib. Félix Alcan, 334 p. Voir p. 94.
- CHADWICK, H., 1900. *Echinus*. *Proc. Trans. Liverpool Biol. Soc.*, **14**, mem. 3 : 28 p., V pls.
- CHEVANCE, L., 1961. Etude comparative de la décalcification des structures osseuses de la capsule otique et des osselets à l'aide de solutions acides usuelles et d'un chélateur (l'acide éthylène diamine tétracétique). Thèse 3^e Cycle, Paris, 45 p. dactylographiées, 14 photos.
- CHÈVREMONT, 1960. *Cytologie et Histologie*. Desoer ed., 991 p. Voir p. 301.
- CUÉNOT, L., 1886. Etudes anatomiques et morphologiques sur les Ophiures. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, sér. 2, **6**: 32-82, pls III-V.

- CUÉNOT, L., 1891. Etudes morphologiques sur les Echinodermes. *Arch. Biol.*, 11 (3 et 4) : 313-680, pls XXIV-XXXI.
- DALLAM, R.D., 1957. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 178.
- DEFRETIN, R., 1952. Sur les mucocytes des podia de quelques Echinodermes. *C.R. Ac. Sc.*, 234: 1806-1808.
- DUBREUIL et BAUDRIMONT, 1959. Manuel théorique et pratique d'Histologie. 5^e édition, Vigot Ed., 639 p. Voir p. 310.
- GÉROULD, J., 1896. The Anatomy and Histology of *Caudina arenata*. *Proc. Boston Soc. Natur. Hist.*, 27: 7-74, pls I-VIII.
- GISLÉN, T., 1924. Echinoderm studies. *Zool. Bidrag.*, 9: 1-iv + 1-316.
- GUISLAIN, R., 1953. Recherches histochimiques sur les canaux de Cuvier. *C.R. Soc. Biol.*, 147: 1254-1256.
- HAMANN, O., 1889. Die Anatomie und Histologie des Ophiuren. *Ztschr. Naturwiss.*, 23: 233-384.
- HYMAN, L.H., 1955. The Invertebrates: Echinodermata. Vol. IV, McGraw-Hill Book Co., vii + 763 p., 280 figs.
- HARTLEIB, J., H. DIEFENBACH, W. SANDRITTER, 1956. *Acta Histochem.*, 2: 196.
- KAUFMANN, B.D., et coll., 1948. Carnegie Year Book, 47: 144.
- KOEHLER, R., 1883. Recherches sur les Echinides des côtes de Provence. Thèse, Fac. Sc. Paris, ou *Ann. Mus. Marseille*, 1 (3) : 167 p., 7 pls.
- LIEBMAN, E., 1950. The leucocytes of *Arbacia*. *Biol. Bull.*, 98: 46-59, fig. 1-3, pl. I-II.
- LISON, L., 1960. Histochimie et Cytologie animales. Gauthier-Villars ed., 2 vol., 842 p., voir vol. I, p. 305.
- MORTENSEN, T., 1932. On *Ophiocanops fugiens*. *Vidensk Meddel. Dansk. Naturhist. Foren.*, 93: 1-21, 16 fig., pl. I.
- NARASIMHAMURTI, N., 1949. The embryology of *Ophiocoma nigra*. *Quart. Jour. Micr. Sc.*, 76: 63-88, pl. V-VI.
- NONIDÉZ et WINDLE, 1949. Textbook of Histology. McGraw-Hill Book Co., Ed. Voir p. 34.
- OLSEN, H., 1942. Development of *Ophiopholis aculeata*. *Bergens Mus. Aarbok Naturvid. Rekke*, n° 6, 1-107, 61 figs.
- SMITH, J.F., 1937. Structure and function of the tube feet in certain Echinoderms. *Jour. Marine Biol. Assoc.*, 22: 345-357, figs. 1-8.
- SMITH, J.F., 1940. The reproductive system and associated organs of *Ophiothrix fragilis*. *Quart. Jour. Micr. Sc.*, 82: 267-309, figs. 1-15.
- SHAVER, J.R., 1954. The distribution of mitochondria in the sea urchin embryos. *Experientia*, 11 (9) : 1955, 351-353.

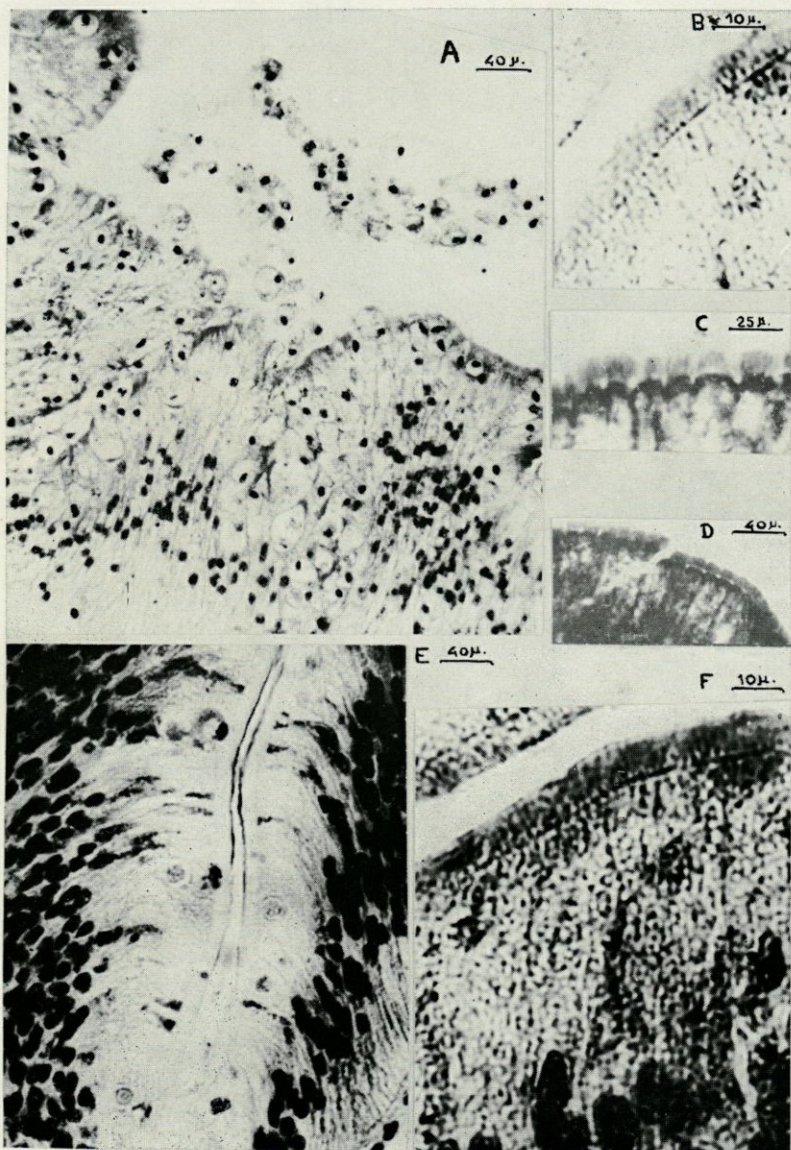


PLANCHE I. — Coelomocytes et structure du plateau strié. A : Migration et accumulation de coelomocytes (Formol 50 % - Hématoxyline-éosine-orange G). B-F : Cadres péricellulaires (Bouin-Hollande enrichi - Trichrome de Prenant). C-D : Structure du plateau strié (Champy enrichi - Hémalun-picro-indigo-carmin). E : Dégénérescence intraépithéliale des coelomocytes, cellules à mucus (Bouin Hollande enrichi, Bleu de Toluidine).

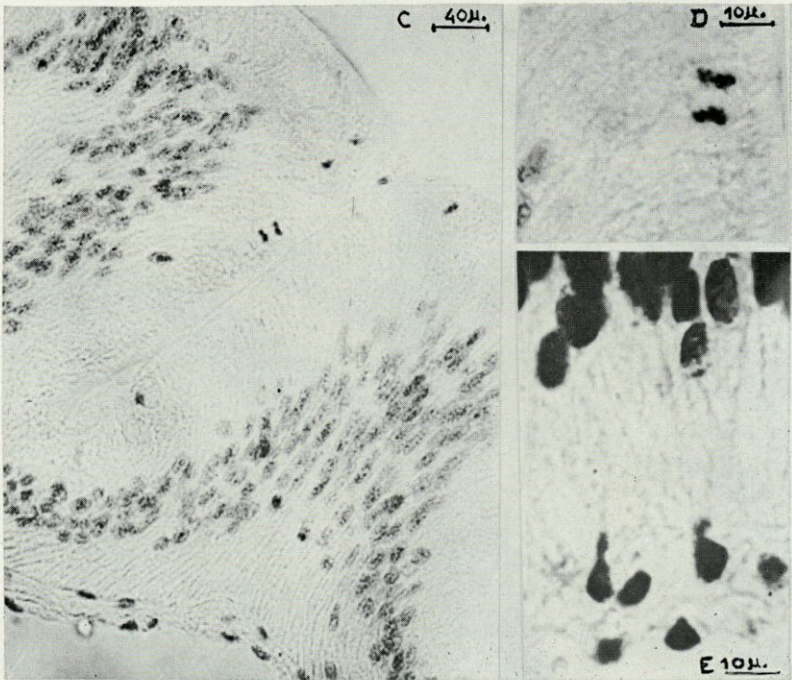
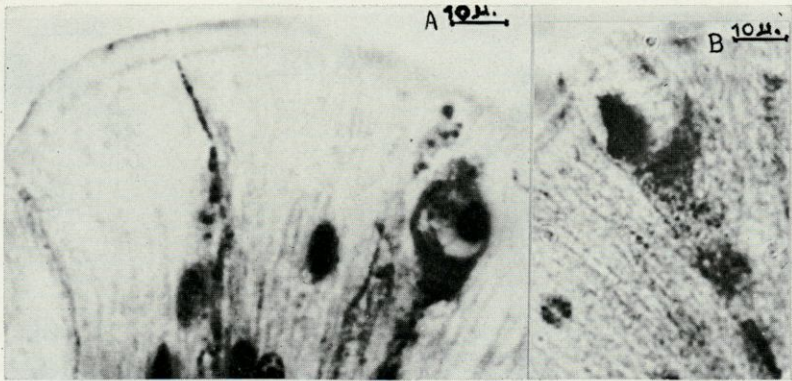


PLANCHE II. — Coelomocytes. A-B : Coelomocyte traversant la zone superficielle de l'épithélium digestif (Bouin-Hollande enrichi, Bleu de Toluidine). C : Coelomocytes dans la paroi digestive, vue générale (Bouin-Hollande enrichi, Feulgen). D : Figure de division d'un coelomocyte (Bouin-Hollande enrichi, Bleu de Toluidine tamponné). E : Figure de migration : passage à travers la membrane basale de l'épithélium (Helly enrichi - Feulgen).

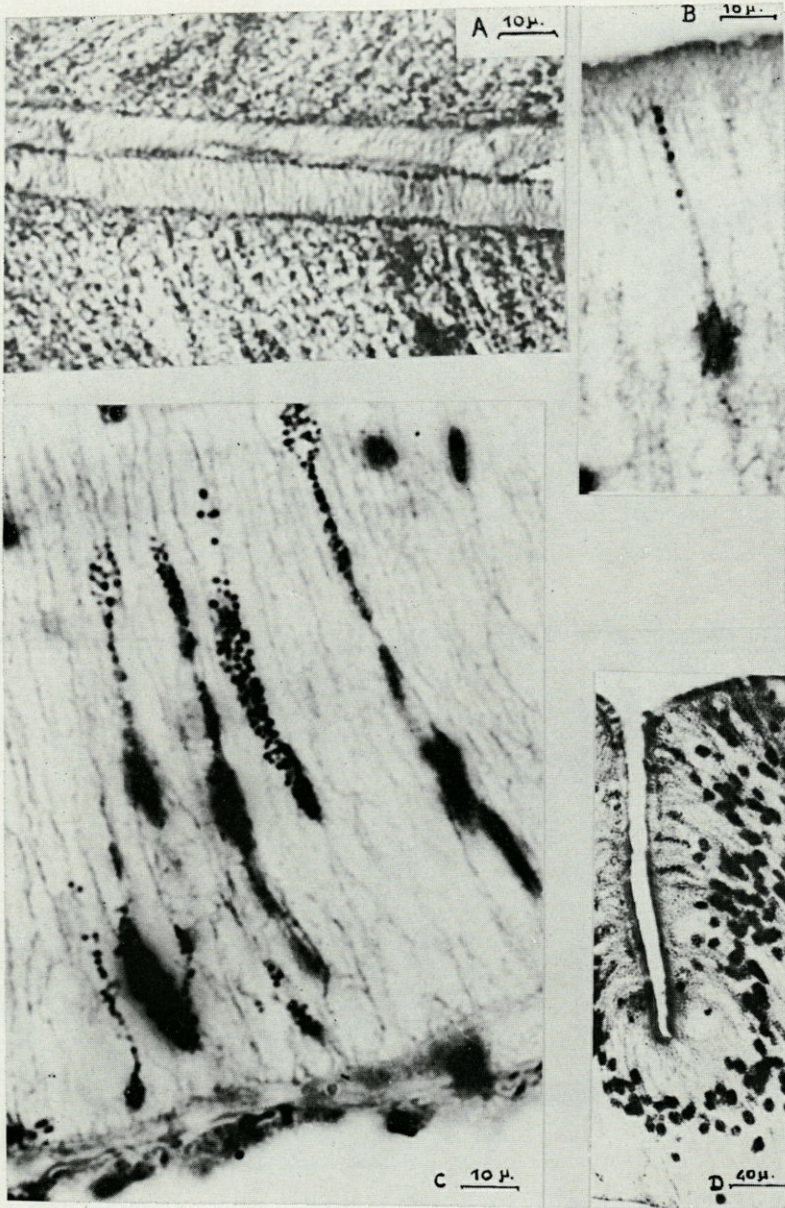


PLANCHE III. — Cellules à mucus, cellules à granulations basophiles. A : Granulations basophiles dans la lumière (Formol 33 %, Azan). B : Portion apicale d'une cellule à mucus (Bouin-Hollande enrichi, trioxyhémathéine-picro-indigo-carmin). C : Portion basale des cellules à granulations basophiles (Bouin Hollande enrichi, trichrome de Prenant). D : Portion apicale des cellules d'un repli épithélial montrant les cellules à mucus (Bouin-Hollande enrichi, Gallocyanine).

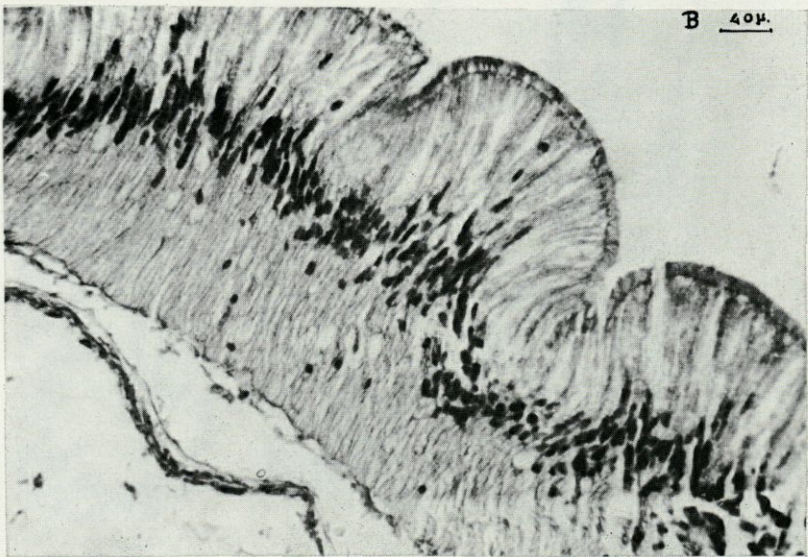
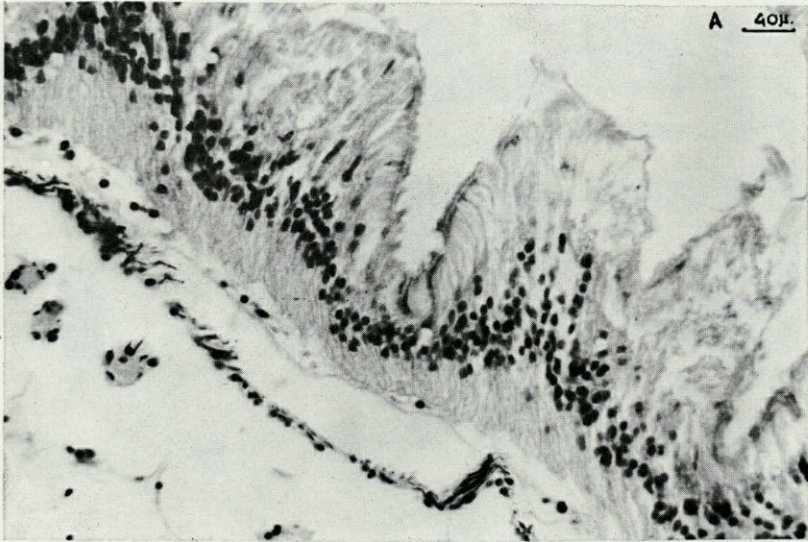


PLANCHE IV. — Fixation au Formol neutre tamponné 10 jours. Pièces prélevées par dissection après la fixation. Coloration au Trichrome de Prenant (On ne tiendra pas compte de la structure des noyaux dont l'aspect sur ces clichés ne dépend que des opérations photographiques. On ne retiendra que les caractères touchant à la disposition générale des noyaux).

PLANCHE IV A. Formol 10 %.

PLANCHE IV B. Formol 20 %.

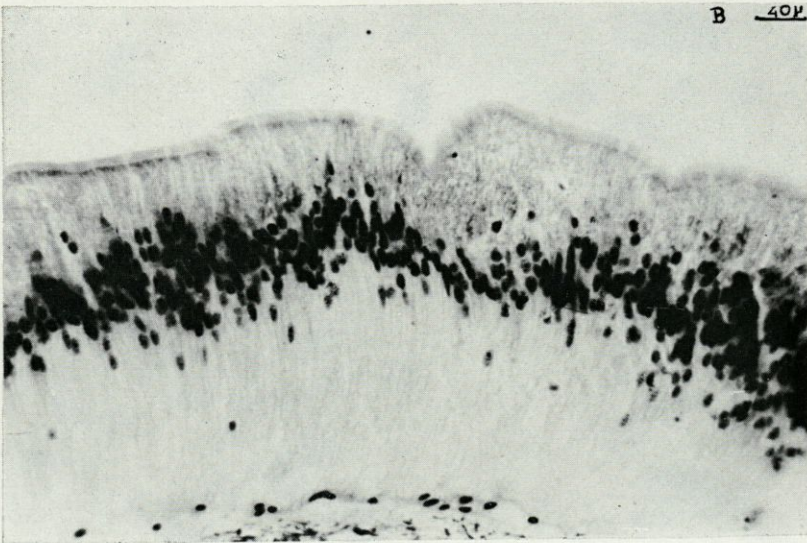
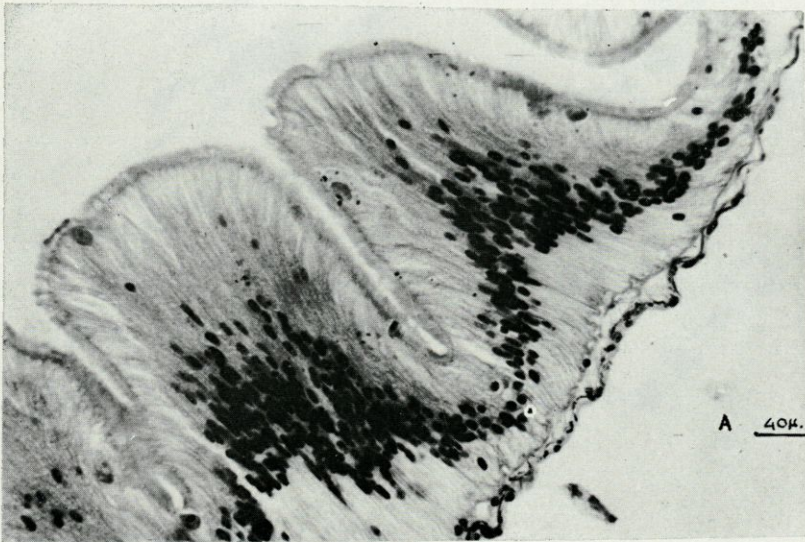


PLANCHE V. — Fixation au Formol neutre tamponné 10 jours. Pièces prélevées par dissection après la fixation. Coloration au Trichrome de Prenant (On ne tiendra pas compte de la structure des noyaux dont l'aspect sur ces clichés ne dépend que des opérations photographiques. On ne retiendra que les caractères touchant à la disposition générale des noyaux).

PLANCHE V A. Formol 50 %.
 PLANCHE V B. Formol commercial pur.

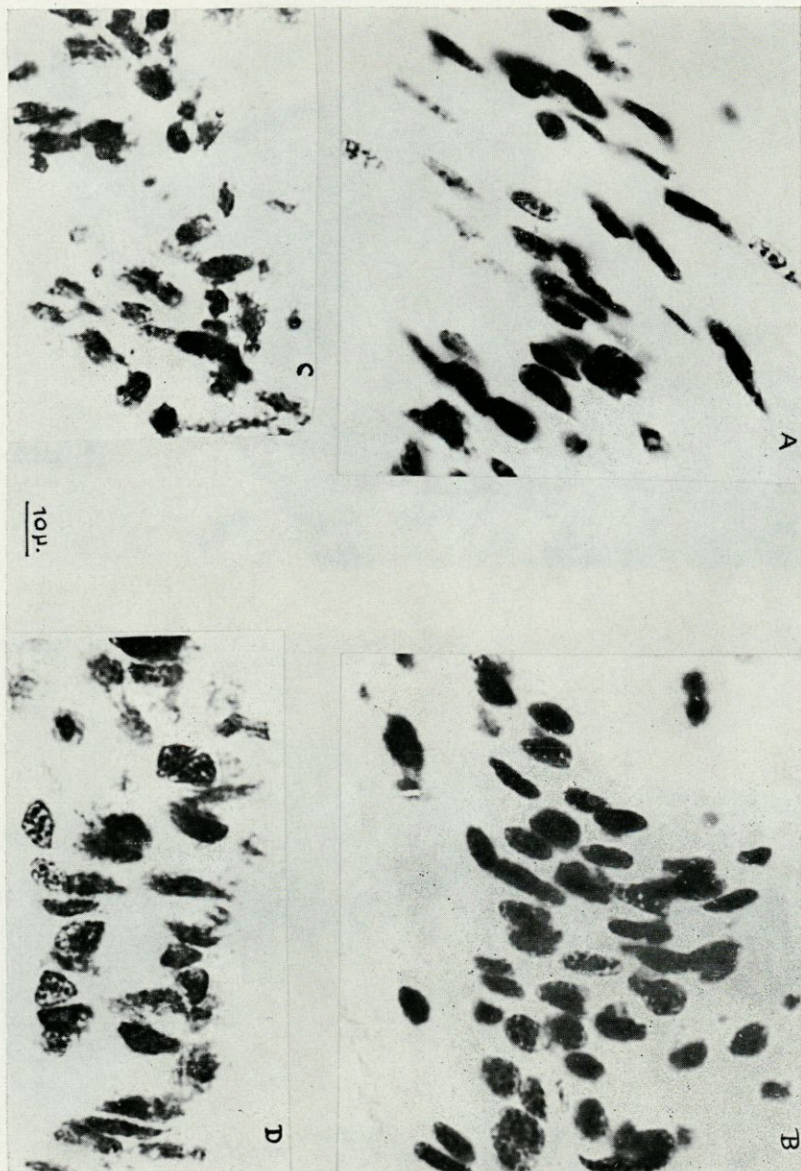


PLANCHE VI. — Fixation au Formol neutre tamponné : les noyaux. Pièces prélevées par dissection après la fixation. Coloration de Feulgen (On ne tiendra pas compte de la structure des noyaux dont l'aspect sur ces clichés ne dépend que des opérations photographiques. On ne retiendra que les caractères touchant à la disposition et à la forme des noyaux).

PLANCHE VI A. Formol pur 1 jour.

PLANCHE VI B. Formol 50 %, 10 jours.

PLANCHE VI C. Formol 10 %, 10 jours.

PLANCHE VI D. Formol 20 %, 10 jours.

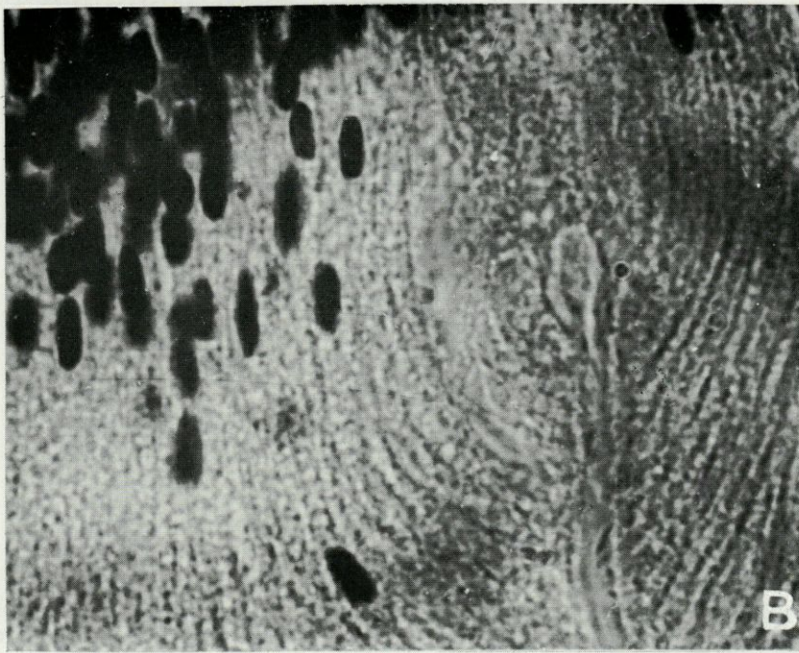
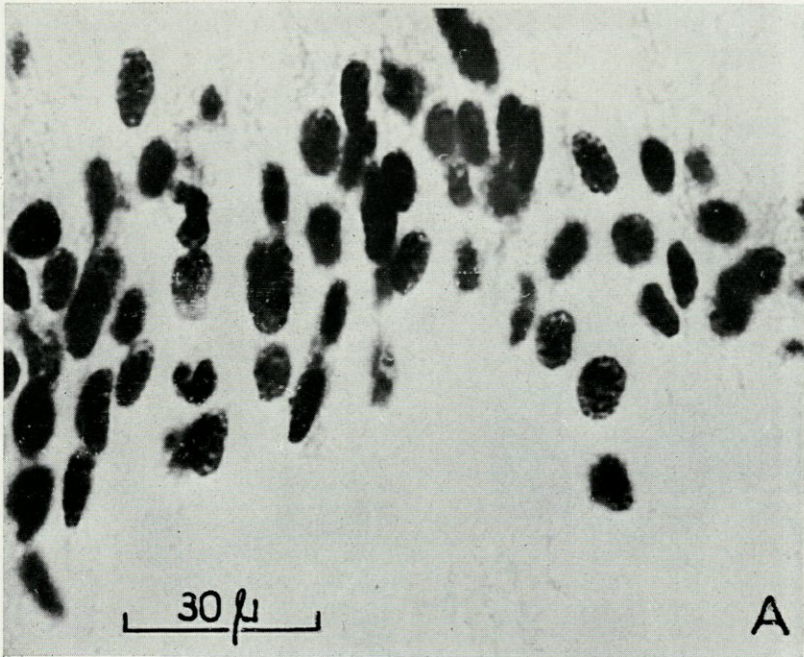


PLANCHE VII. — Fixation au Formol neutre tamponné : les noyaux. Pièces prélevées par dissection après la fixation. Coloration de Feulgen (On ne tiendra pas compte de la structure des noyaux dont l'aspect sur ces clichés ne dépend que des opérations photographiques. On ne retiendra que les caractères touchant à la disposition et à la forme des noyaux).

PLANCHE VII A, B. Formol pur, 10 jours.

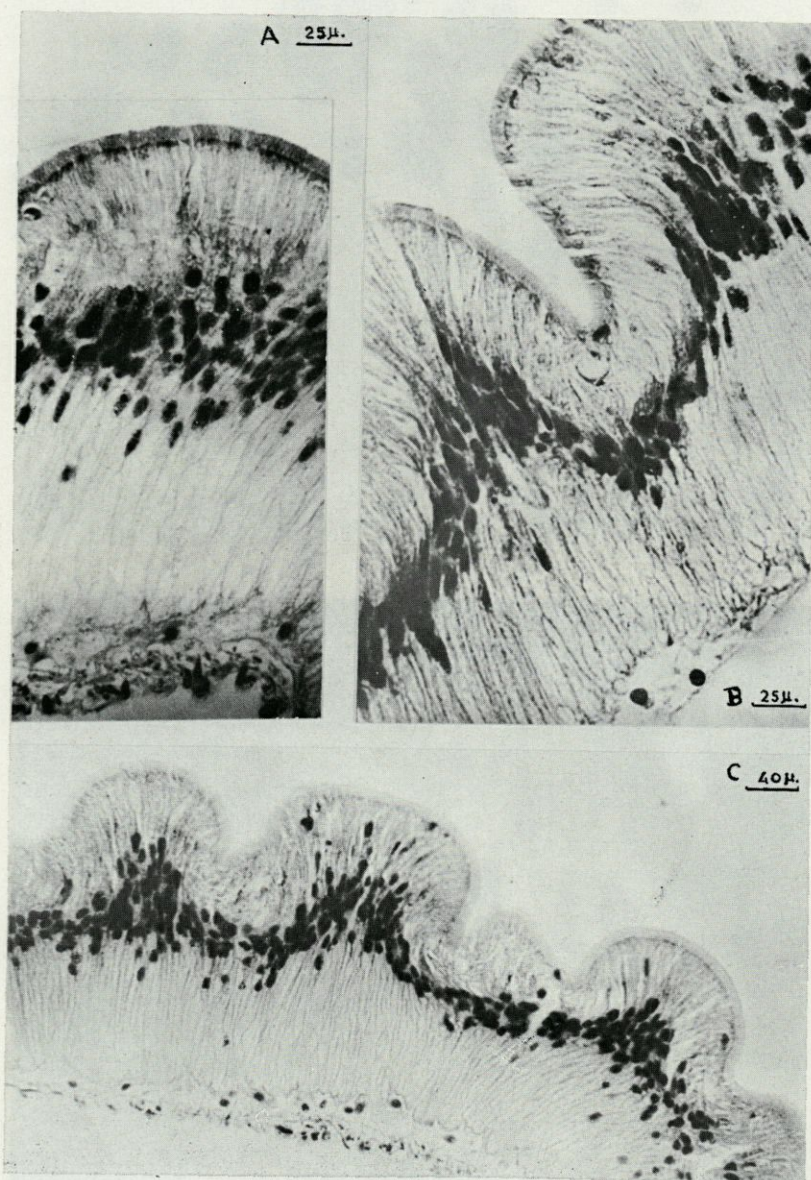


PLANCHE VIII. — A : Fixation au formol pur neutre tamponné 1 jour (Trichrome de Prenant). B : Fixation au Champy enrichi, 48 heures (Feulgen) (On observera les vacuoles d'autolyse). C : Fixation au Helly enrichi (Formol 50 %), 6 h.

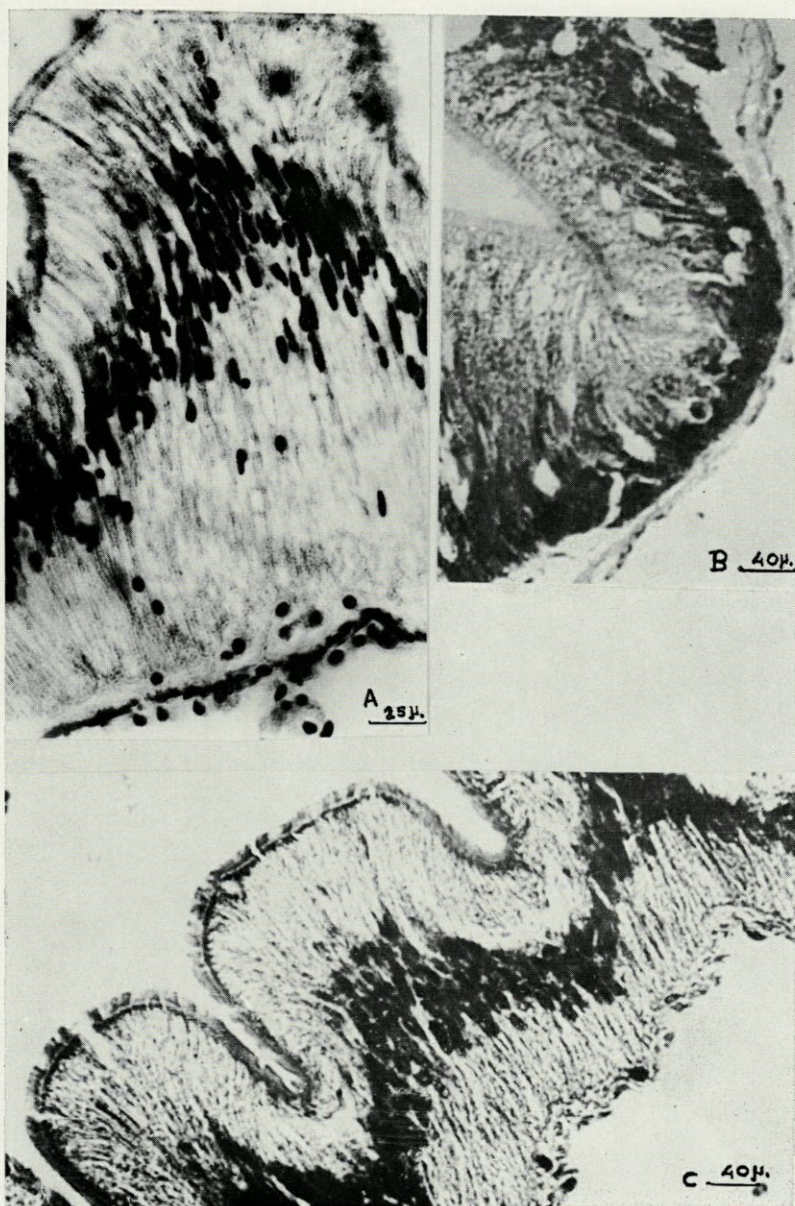


PLANCHE IX. — Fixation au formol pur neutre tamponné, 10 jours. Divers aspects.

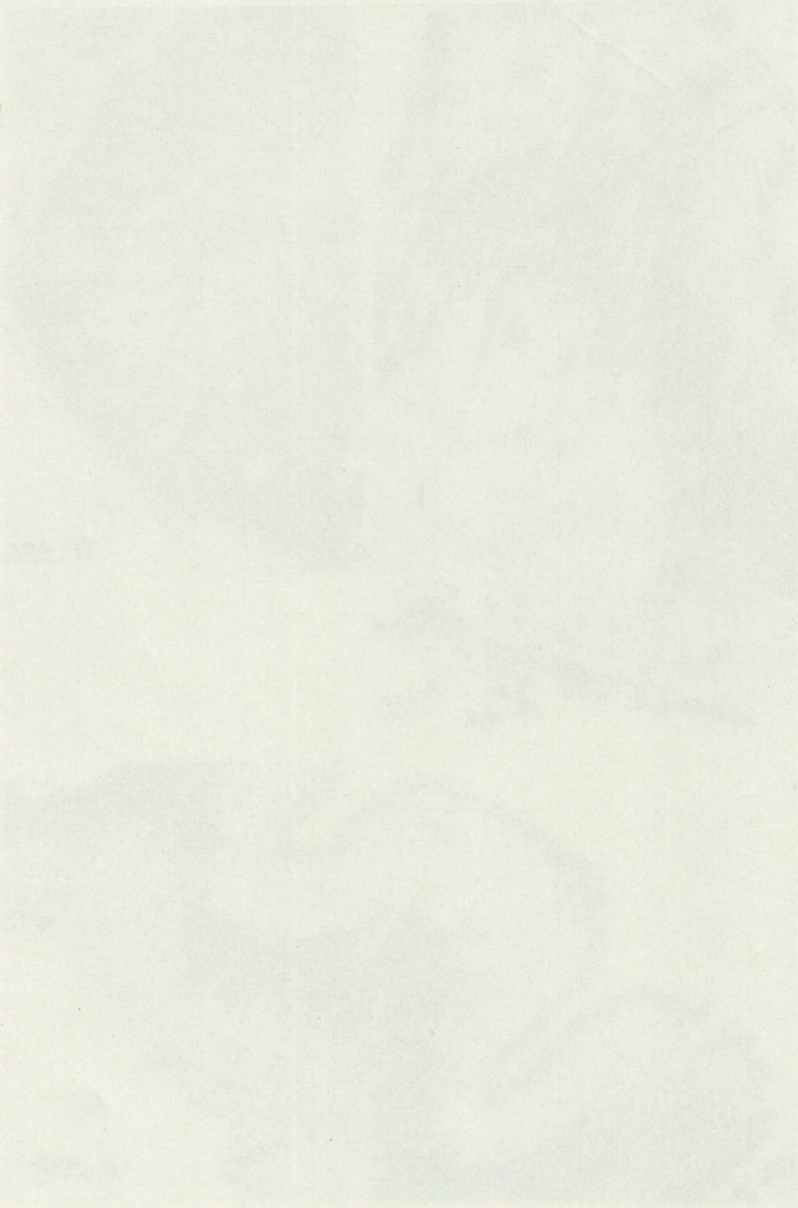


Figure 11 - Section of the