

## ÉTUDE HISTOCHIMIQUE DES MUCINES DUODÉNALES DU LAPIN

J. MORÉ et M. BAYLE

*Station de Pharmacologie-Toxicologie, I. N. R. A.,  
180, Chemin de Tournefeuille  
31 - Toulouse (03)*

---

### RÉSUMÉ

Les techniques récentes de l'histochemie des mucosubstances ont été appliquées au duodénum du Lapin. De notre étude, il ressort que les cellules calciformes synthétisent des mucines carboxylées et des mucines fortement sulfatées. Les cellules claires des glandes de Brünner élaborent essentiellement des mucines carboxylées riches en acide sialique. Le rôle de ces mucines est envisagé.

---

### INTRODUCTION

La connaissance de l'anatomie du duodénum du Lapin est déjà ancienne ; sa configuration a, de tout temps, suscité l'intérêt des observateurs (BERDAL, 1906 ; CARLTON, 1935 ; MICHELAT, 1967).

En effet, l'organe se caractérise par deux particularités essentielles : d'une part sa longueur qui peut atteindre 50 cm chez les sujets de grande taille, ce qui est considérable comparativement aux 25 cm du duodénum humain (MICHELAT, 1967) ; d'autre part la présence de trois types d'acini (mucoïdes, séreux et mixtes) qui sont l'apanage du Lapin et du Cheval et constituent la couche des glandes de Brünner (BERDAL, 1906).

Par contre, l'histochemie du tube digestif du Lapin est encore pratiquement ignorée. C'est pourquoi nous avons cru bon d'entreprendre la mise en évidence des sécrétions muqueuses du duodénum, poursuivant ainsi l'étude du tractus digestif ébauchée par nos travaux antérieurs sur l'estomac (MORÉ, 1970 ; MORÉ *et al.*, 1971).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mucines épithéliales de la muqueuse de l'organe à savoir :

- celles des cellules calciformes de l'épithélium superficiel et des glandes de Lieberkühn ;
- celles des cellules claires des glandes de Brünner.

## MATÉRIEL, D'ÉTUDE ET TECHNIQUES

*Matériel d'étude*

Les dix animaux utilisés appartenaient à l'élevage du Laboratoire. Nous n'avons retenu que des sujets apparemment sains, n'ayant servi à aucune expérience préalable.

Pour chaque animal, nous avons pratiqué dix prélèvements régulièrement espacés sur toute la longueur du duodénum.

*Techniques*

— La fixation a varié suivant la nature des réactions histochimiques ultérieures (formol, formol neutralisé, mélange de Duboscq-Brasil, fixateur de Kolster, liquide de Carnoy) ainsi que le mode de déshydratation (acétone, éthanol).

— Les réactions histochimiques :

— Acide periodique — réactif de Schiff (APS) selon GABE (1968) pour l'étude des mucines riches en alpha-glycols (mucines neutres et certaines mucines acides),

— APS amylase pour l'élimination éventuelle du glycogène,

— Azur A (Gurr C. I. n° 52005, lot 23209) à 1 p. 5 000 pendant 30 mn dans :

• Tampon Mc Ilvaine pH 5,

• Tampon Mc Ilvaine pH 3,

• HCl 0,5 N,

pour le diagnostic différentiel histochimique des mucosubstances (PEARSE, 1968).

— Bleu Alcian 8GX (Gurr C. I. n° 74240, lot 13794) à 1 p. 100 dans :

• HCl 0,5 N, pH 0,3,

• HCl 0,1 N, pH 1,

• CH<sub>3</sub>COOH à 3 p. 100 pH 3,

pour la différenciation des mucosubstances acides carboxylées et sulfatées (LEV et SPICER, 1964).

— Bleu alcian 8GX (Gurr C. I. n° 74240, lot 13794) dans tampon acéto-acétique 0,05 N, pH 5,8 pendant 30 mn en présence de forces croissantes de MgCl<sub>2</sub> pour la recherche des concentrations électrolytiques critiques (SCOTT *et al.*, 1964 ; STOCKWELL et SCOTT, 1965).

— Les traitements chimiques et enzymatiques :

— méthylation forte (60°C pendant 4 h.) qui supprime la basophilie des mucines carboxylées et provoque la méthanolyse des sulfomucines, puis saponification qui désestérifie les groupes carboxylés et leur restitue leur basophilie tandis que les groupes sulfatés ont été définitivement éliminés (LILLIE et FISCHER, 1954) ;

— action de la hyaluronidase testiculaire (BDH), 100 UI par mg dans tampon acéto-acétique pH 5,5 qui élimine l'acide hyaluronique, puis coloration par le Bleu alcian (LILLIE, 1965) ;

— digestion par la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (BDH), 500 UI par mg dans tampon phosphate pH 6 qui hydrolyse l'acide sialique puis coloration au bleu Alcian (LILLIE, 1965).

## RÉSULTATS

*Les cellules caliciformes de l'épithélium des villosités et des glandes de Lieberkühn.*

Ces cellules, fortement APS positives, sont donc richement pourvues en mucines contenant des groupements alpha-glycols. Comme la réaction persiste après hydrolyse par l'amylase salivaire, il ne s'agit pas de glycogène.

L'affinité des cellules caliciformes pour le bleu Alcian à pH 2,6 ainsi que le virage métachromatique de l'azur A obtenu à pH 5 montrent bien que nous sommes en présence de mucines acides de deux types :

— d'une part, celles dont l'alcianophilie réapparaît après saponification et

qui ont subi une pré-méthylation à 60°C : ce sont des mucines acides carboxylées puisque la méthylation préalable a définitivement éliminé les esters sulfatés ;

— d'autre part, les mucines Alcian positives à pH 1 (et parfois même 0,5) et qui, de plus, sont métachromatiques (métachromasie- $\beta$ ) jusqu'à pH 0,5 pour certaines. Il s'agit donc de mucines sulfatées qui seules présentent un point isoélectrique assez bas pour être dissociées et colorées dans ces conditions.

TABLEAU I

Méthodes histochimiques		Structures intéressées	
		Cellules caliciformes	Cellules claires des glandes de Brünner
APS		+++	+++
APS amylase		+++	+++
Métachromasie à l'azur A	pH 5 pH 3 pH 0,5	$\gamma$ $\beta$ $\beta$	$\gamma$ $\beta$ —
Bleu Alcian 1 %	pH 2,6	+++	+++
	pH 1	+++	+—
	pH 0,5	+—	—
Bleu Alcian 0,1 % pH 5,8 + MgCl <sub>2</sub>	0,1 M	+++	++
	0,2 M	+++	+
	0,3 M	+++	—
	0,6 M	++	—
	0,7 M	+—	—
	0,8 M	+—	—
	0,9 M 1 M	— —	— —
Bleu Alcian 1 % pH 2,6 après :	Hyaluronidase	Action nulle	Action nulle
	Sialidase	Perte sensible de l'alcianophilie	Perte très sensible de l'alcianophilie
	Méthylation Saponification	++	++

1° L'intensité des colorations est exprimée par des signes allant de +++ (réaction très forte) à — (réaction nulle).

2° La réaction aux thiazines est exprimée en métachromasie- $\gamma$  (rose-rouge à rose) ou métachromasie- $\beta$  (violette).

De l'alcianophilie observée pour des concentrations en MgCl<sub>2</sub> allant jusqu'à 0,6 M, nous pouvons conclure que nous sommes en présence de polyanions sulfatés que l'on peut rapprocher des sulfates de chondroïtine.

Enfin, l'action nulle de la hyaluronidase prouve l'absence d'acide hyaluronique histochimiquement décelable, tandis que la perte sensible d'affinité pour le bleu

Alcian, observée après hydrolyse par la neuraminidase, plaide en faveur de la présence d'acide sialique dans les cellules caliciformes.

*Les cellules mucoïdes des glandes de Brünner.*

Comme les cellules caliciformes, ces cellules sont positives à l'APS même après hydrolyse par l'amylase salivaire. Elles donnent une métachromasie- $\gamma$  à l'azur A à pH 5 et sont alcianophiles jusqu'à pH 2,6. Elles contiennent donc des mucines acides.

Mais à la différence des cellules caliciformes, ces éléments perdent pour la plupart leur alcianophilie à pH 1. Elles sécrètent donc essentiellement des mucines carboxylées. Ce fait est d'ailleurs confirmé par l'absence d'affinité pour le bleu Alcian en présence d'une concentration en  $MgCl_2$  supérieure à 0,2 M.

La perte très sensible de colorabilité par le bleu Alcian, après action de la neuraminidase, prouve qu'elles renferment de l'acide sialique (polysaccharide carboxylé) en quantité notable. Par contre, la digestion par la hyaluronidase reste sans effet.

On peut souligner que les entérocytes et les cellules séreuses des glandes de Brünner se sont toujours montrées négatives aux réactions spécifiques des polysaccharides macromoléculaires.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Si les cellules caliciformes présentent, chez le Lapin, des caractéristiques histologiques identiques à celles des autres Mammifères, il n'en est pas de même des cellules claires des glandes de Brünner.

En effet, chez de nombreuses espèces, ces éléments sécrètent des mucines dépourvues de radicaux carboxylés ou sulfatés. Or, on a pu montrer (FARBER, 1960 ; VILTER, 1968) que les polysaccharides acides avaient un rôle physiologique important, puisque, suivant le pH du milieu, les groupements anioniques peuvent s'ioniser et se comporter comme des résines échangeuses d'ions. Il est donc frappant de constater la grande abondance de ces polyanions biologiques chez un animal sécrétant un suc gastrique de très faible pH : 1,8 selon BEAUVILLE et RAYNAUD (1963). Il semble donc que le rôle de la sécrétion duodénale consiste à tamponner un chyme excessivement acide provenant de l'estomac. Ce pouvoir tampon est considérable puisqu'une perfusion d'acide chlorhydrique respecte l'intégrité de l'épithélium de l'organe. Par contre, la suppression de la sécrétion des glandes de Brünner, par administration de cinophène, par exemple, entraîne l'apparition d'ulcères (GROSSMAN, 1958).

Enfin, l'importance de la biosynthèse des polysaccharides acides est un des facteurs essentiels de la guérison des lésions traumatiques ou irritatives de l'intestin, comme l'ont montré LAYTON *et al.* (1958). Là encore, il faut reconnaître l'utilité des mucines acides chez une espèce particulièrement sujette aux affections intestinales. Mais, il faut cependant remarquer que les polysaccharides ne sont pas le seul constituant des mucines gastriques. En effet, ces polyanions sont associés à une partie protéique. Celle-ci, riche en acides aminés aromatiques et soufrés (BAYLE, 1971), leur confère des propriétés physiques et chimiques supplémentaires qui sont encore loin d'être bien comprises et correctement interprétées.

*Reçu pour publication en avril 1972.*

## SUMMARY

## HISTOCHEMICAL STUDY OF DUODENAL MUCOSUBSTANCES OF THE RABBIT

Recent histochemical methods for mucosubstances (SCOTT *et al.*, 1964; LEV and SPICER, 1964; LILLIE, 1965; STOCKWELL and SCOTT, 1965; PEARSE, 1968) have been applied to goblet cells of the duodenal epithelium and to light cells of Brünner's glands.

From our study it is evident that calciform cells synthesize carboxylated mucins and some heavily sulphated mucins resembling chondroitin sulphate. On the other hand, the light cells of Brünner's glands essentially elaborate the carboxylated mucins rich in sialic acid but lacking hyaluronic acid (table 1).

The role of these mucins is considered in relation to their ability to buffer against the particularly acid chyme of the stomach; but also considering the special role played by acid polysaccharides in the wound-healing processes (LAYTON *et al.*, 1958) in a species where digestive disorder are particularly frequent.

## РЕЗЮМЕ

Гистохимическое исследование дуоденальных муцинов кролика.

Новейшие методы гистохимии слизистых веществ (SCOTT и сот., 1964; LEV и SPICER, 1964; LILLIE, 1965; STOCKWELL и SCOTT, 1965; PEARSE, 1968) применялись к чашкообразным клеткам (goblet cells) эпителий и мукоидным клеткам (light cells) брүннерных желез.

Из нашего исследования вытекает, что чашкообразные клетки синтезируют карбоксильные муцины и богатые сульфатами муцины, которые приближаются к хондроитинным сульфатам. Наоборот, светлые клетки брүннерных желез выделяют исключительно карбоксильные муцины богатые сialiчными кислотами, но где отсутствует гиалуроническая кислота (Таблица 1).

Роль этих муцин рассматривалась на плане их тампонной способности по отношению к особенно кислого химуса, происходящего из желудка; но также по отношению к особой роли, которую играют полисахаридные кислоты в процессе вылечивания повреждений (LAYTON и сот., 1958) у одного рода животных, в котором особенно часто встречаются заболевания пищеварительного тракта.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAYLE M., 1971. *Contribution à l'étude histologique et histochimique du duodénum du Lapin*. Thèse Doct. Méd. vétér., **58**, juin 1971.
- BEAUVILLE M., RAYNAUD P., 1963. Recherches sur l'activité peptique pendant le nyctémère. *J. Physiol. Fr.*, **55**, 625-629.
- BERDAL H., 1906. *Nouveaux éléments d'histologie normale*. Maloine, Paris, 6<sup>e</sup> Éd., 1 vol., 538 p.
- CARLTON A., 1935. The distribution of Brünner's glands in the duodenum of mammals. *Proc. zool. Soc.*, **2**, 385-390.
- FARBER S. J., 1960. Mucopolysaccharides and sodium metabolism. *Circulation*, **21**, 941-947.
- GABE M., 1968. *Techniques histologiques*. Masson et C<sup>ie</sup>, Paris, 1 vol., 1113 p.

- GROSSMAN M. I., 1958. The glands of Brünner. *Physiol. rev.*, **38**, 675-690.
- LAYTON L. L., FRANKEL D. R., SHER I. H., SCAFA S., FRIEDLER G., 1958. Importance of the synthesis of acidic polysaccharide for wound healing. *Nature*, **181**, 1543-1544.
- LEV R., SPICER S. S., 1964. Specific staining of sulfate groups with Alcian blue at low pH. *J. Histochem Cytochem.*, **12**, 309.
- LILLIE R. D., 1965. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. Blakiston, New York, 3rd Ed., 1 vol., 715 p.
- LILLIE R. D., FISCHER R., 1954. The effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.*, **2**, 81-87.
- MICHELAT J., 1967. Notes sur l'anatomie du Lapin. II, le duodénum. *Rec. Méd. vétér.*, **143**, 869-877.
- MORÉ J., 1970. Contribution à l'étude histologique et histochimique de l'estomac du Lapin. *Rech. vétér.*, **2**, 1-26.
- MORÉ J., BEAUVILLE M., VERNAY M., 1971. Composition électrolytique du suc et étude histologique des poches fundiques à sécrétion neutre de l'estomac du Lapin. *Ann. Rech. vétér.*, **2**, 91-98.
- PEARSE A. G. E., 1968. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill, London, 1 vol., 759 p.
- SCOTT J., DORLING J., QUINTERELLI G., 1964. Differential staining of acid glycosaminoglycans by Alcian blue in salt solutions. *Biochem. J.*, **91**, 4 P-5 P.
- STOCKWELL R. A., SCOTT J. E., 1965. Observations on the acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) content of the matrix of ageing cartilage. *Ann. rheumatic Dis.*, **24**, 341-350.
- VILTER V., 1968. Contribution à l'étude du mécanisme de la méthylation dans l'histochimie des mucines acides. *Ann. Histochem.*, **13**, 205-220.
-