

Vème REUNION DES INSTITUTS DE RECHERCHES SUR LES VIANDES
Paris, 7 - 12 Septembre 1959

N° 9

ETUDE CRITIQUE DE DIFFERENTS FIXATEURS DU TISSU MUSCULAIRE

Bernard-L. DUMONT et Jacqueline PARIS
Station de Recherches sur l'Elevage
C.N.R.Z. JOUY en JOSAS - France (*)

INTRODUCTION -

TECHNIQUES d'ETUDE :

- Nature des échantillons étudiés ; prélèvement des échantillons
- Fixateurs utilisés
- Préparation des coupes
- Caractéristiques étudiées

RESULTATS -

DISCUSSION -

RESUME -

INTRODUCTION -

Dans tous les travaux de recherche intéressant la production de la viande et sa technologie, la connaissance précise de la structure musculaire est fondamentale.

Comparées aux recherches effectuées dans les autres domaines intéressant la viande (chimie, bactériologie), les études histologiques ont été, jusqu'à présent, relativement peu nombreuses et nos connaissances sur ce sujet sont nettement insuffisantes. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne l'influence des différents facteurs d'élevage (espèce, âge, sexe, niveau d'alimentation) sur l'organisation musculaire des animaux de boucherie. Comme le fait justement remarquer JOUBERT (1) dans la conclusion de son important travail sur l'analyse des facteurs agissant sur la croissance post-natale de la fibre musculaire, "un secteur de recherche extrêmement vaste reste offert aux chercheurs dans ce domaine".

....

(*) Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique de Mme J. CARRAUD

L'étude histologique de la musculature, relativement négligée jusqu'à maintenant, doit connaître dans l'avenir un développement important, étant donné les conséquences de la structure musculaire sur la qualité des viandes et leur utilisation technologique. Nous partageons pleinement l'opinion émise à ce propos par VAN GILS l'an dernier, à la réunion de Cambridge (2).

L'une des raisons qui peut expliquer la désaffection des chercheurs pour les travaux histologiques est certainement le caractère fastidieux de ces travaux. On peut penser que cette opinion a été largement accréditée par le fait que les techniques d'étude du tissu musculaire (celles que l'on peut trouver dans les manuels d'histologie) ne donnent pas pleinement satisfaction à leurs utilisateurs. La preuve en est que les illustrations photographiques qui accompagnent les publications réalisées sur ces problèmes montrent, presque sans exception, que les préparations de muscle frais (prélevé immédiatement après la mort) présentent des altérations diverses, notamment des dissociations de fibres. De ce fait, elles ne peuvent être considérées comme représentatives de la structure musculaire de l'animal, "in vivo".

Dans un programme de travail relatif à l'étude des modifications de la structure musculaire (taille des fibres, taille des faisceaux) au cours de la croissance des animaux de boucherie, nous avons été amenés à utiliser différents types de fixateurs, pour conserver la structure du muscle.

Nous voudrions présenter ici, sous le titre "Etude critique de différents fixateurs du tissu musculaire", les observations que nous avons faites sur les mérites respectifs de ces différents produits.

TECHNIQUES UTILISEES -

1°) Nature des échantillons étudiés - Prélèvement des échantillons

Notre étude a porté sur le diaphragme du porc et sur 3 muscles de boeuf (pectoral ascendant, long vaste et grand psoas). Les porcs étudiés pesaient 100 kg. vif et les bovins, âgés de 24 à 30 mois, pesaient de 550 à 600 kg.

Des portions de muscle étaient prélevées sur la carcasse, le plus rapidement possible après le sacrifice des animaux dans les abattoirs de notre Centre. Sur les portions de muscle ainsi prélevées, nous isolions 3 échantillons, en suivant la direction générale des fibres musculaires. Compte tenu du temps nécessaire pour l'abattage, l'éviscération et l'habillage des animaux, nous estimons que les échantillons étaient placés dans le liquide de fixation dans un délai maximum de 1 heure après la mort.

La taille moyenne des échantillons était de 20 à 25 mm. de long et de quelques millimètres d'épaisseur (3 à 7 mm.).

2°) Fixateurs utilisés

Les fixateurs utilisés furent les suivants :

a/ sur le porc

- Formol I à 10 % de la solution du commerce, soit à 3 %
 (en poids) de HCHO
- Formol II à 10 % (en poids) de HCHO

(préalablement à leur emploi, les solutions de Formol I et II étaient neutralisées par CO_2Na_2)

- Formol/Alcool/Acide acétique
 - { 90 cc alcool éthylique à 50 %
 - { 5 cc formol II
 - { 5 cc acide acétique cristallisable
- Carnoy
 - { chloroforme 3 volumes
 - { alcool absolu 6 volumes
 - { acide acétique cristallisable 1 volume
- Zenker
 - { bichlorure de mercure 5 g
 - { bichromate de potassium 2,5 g
 - { sulfate de sodium 1
 - { eau distillée 100 cc
 - { acide acétique (ajouté au moment de l'emploi) 5 cc
- Bouin à l'eau
 - { solution aqueuse saturée d'acide picrique 30 vol.
 - { formol (à 30 % en poids de HCHO) 10 vol.
 - { acide acétique cristallisable 2 vol.
- Alcool-acide acétique
 - { acide acétique cristallisable 1 volume
 - { alcool absolu 3 volumes

b/ sur le boeuf

- Alcool-acide acétique
- Zenker
- Formol I
- Sublimé acétique
 - { acide acétique cristallisable 5 cc.
 - { solution aqueuse saturée de bichlorure
 de mercure 95 cc
- Gilson
 - { on sature de bichlorure de mercure la solution
 suivante :
 - { alcool absolu 1 volume
 - { acide acétique cristallisable 1 volume
 - { chloroforme 1 volume

....

Le tableau I indique, pour chacun de ces fixateurs, les temps de fixation étudiés :

Fixateur	Espèce	Durée de fixation	Nombre d'échantillons étudiés
Formol I	Porc	10 heures / 120 heures / 1 semaine 3 semaines / 6 mois	42 pour chaque durée de fixation
	Boeuf	10 heures	9
Formol II	Porc	10 heures / 120 heures / 1 semaine 3 semaines / 6 mois	42 pour chaque durée de fixation
Formol-Alcool- Acide acétique	Porc	4 heures	12
Alcool-acide acétique	Porc	10 heures	42
	Boeuf	10 heures	18
Carnoy	Porc	10 heures	12
Zenker	Porc	24 heures	9
	Boeuf	24 heures	18
Bouin à l'eau	Porc	24 heures / 4 jours	9 pour chaque durée de fixation
Gilson Sublimé acétique	Boeuf	Pour ces deux fixateurs, le séjour dans le fixateur était arrêté lorsque l'échantillon était devenu blanc ; la durée de fixation varie avec la taille des échantillons (elle est de l'ordre de quelques heures pour des échantillons comparables à ceux que nous avons étudiés)	
			18 pour chaque fixateur

3°) Préparation des coupes

Après la fixation, la technique suivante fut utilisée :

- lavage (pour les fixateurs contenant du sublimé, passage à l'alcool iodé pour éliminer le sublimé (Dezenkerisation))
- deshydratation (alcool éthylique, alcool butylique)
- inclusion à la paraffine (3 bains de 2 heures)
- coupe à 5 et 7 μ
- coloration à l'hémalum-éosine.

4°) Caractéristiques étudiées

Pour chaque échantillon, nous avons examiné une vingtaine de coupes, prises à des niveaux différents. Sur chaque coupe nous avons observé les caractéristiques suivantes :

- fixation : conservation de la **structure** cytoplasmique des fibres et de la structure du conjonctif
- dissociation : état de cohésion des faisceaux musculaires et des fibres
- coloration : uniformité et qualité de la coloration

En outre, au cours de la préparation des coupes, étaient jugées la dureté des échantillons inclus et la facilité de la coupe au microtome.

RESULTATS -

Nous avons résumé dans le tableau suivant (tableau II) les principales caractéristiques observées sur les coupes obtenues par les différents types de fixation. D'une façon générale, les croix indiquent la qualité de la préparation et les signes - les défauts.

Tableau II - Caractéristiques des différents fixateurs étudiés

Fixateur	Dureté de l'échantillon: inclus et facilité de coupe	Fixation	Dissociation	Coloration
Formol I (porc)	-	-	- à ++	++
(boeuf)	-	-	++ à +++	+
Formol II (porc)	-	-	- à ++	++
Formol-Alcool-acide acétique (porc)	++	+ -	++ à +++	++
Carnoy (porc)	++	+ -	- à +	++
Bouin 24 heures (porc)	++	-	++	++
Bouin 4 jours (porc)	++	+ -	+ à ++	++
alcool-acide acétique (porc)	+ (pas assez dur)	+ à ++ -	++ à +++	++
(boeuf)	+ (pas assez dur)	+ à ++ -	++ à +++	++
Zenker (porc)	-	-	-	++
(boeuf)	-	-	-	++
Sublimé acétique (boeuf)	++	+ -	- à +	++
Gilson (boeuf)	++	+	++ à +++	++

Signification des symboles employés dans ce tableau :

- Dureté et facilité de coupe .. ++ pas de difficulté à couper
+ peu de difficulté à couper
- coupe difficile (trop ou pas assez dur)
- Fixation ++ fixation bonne et homogène du tissu musculaire et du conjonctif
+ bonne fixation, ou des fibres, ou du tissu conjonctif
+ fixation non homogène des échantillons
- mauvaise fixation
- Dissociation +++ faisceaux et fibres non dissociés
+++ les faisceaux sont légèrement dissociés ou quelques fibres sont dissociées
++ faisceaux dissociés et fibres peu jointives
+ quelques fibres jointives
- tissu musculaire entièrement dissocié
- Coloration ++ homogène et intense
+ coloration manquant d'intensité

a/ Formol I (solution de formol à 10 % de la solution du commerce, soit à 3 % de HCHO)

- cas du porc la fixation est mauvaise. Le cytoplasme des fibres présente de nombreuses altérations et ce, quelle que soit la durée de fixation. Les fibres sont généralement dissociées (dans quelques préparations toutefois, les fibres de certains faisceaux sont relativement peu dissociées). Dans l'ensemble, la coloration est bonne, quelquefois cependant peu intense.
- cas du boeuf la fixation est également mauvaise. La dissociation des faisceaux, bien que constante, est moins marquée que dans le cas du porc. Dans de nombreuses plages des préparations, les fibres sont assez bien jointives à l'intérieur de leurs faisceaux

b/ Formol II (à 10 % de HCHO)

Mêmes remarques que pour le formol I

c/ Formol-Alcool-Acide acétique

La fixation est inégale d'une plage à l'autre de la préparation. Par rapport aux deux fixateurs précédents, la fixation est légèrement meilleure. La dissociation est elle-même inégale. Certains faisceaux présentent des fibres assez jointives. La coloration est bonne.

d/ Carnoy

La fixation est mauvaise, la préparation ne montrant généralement que quelques fibres bien conservées. La dissociation est très marquée (sur certaines coupes, les fibres de la partie périphérique sont assez jointives, sur une épaisseur de 4 à 5 fibres. La coloration est bonne.

e/ Bouin à l'eau

- 24 heures de fixation :

La fixation est mauvaise. Les faisceaux sont dissociés, mais la plupart du temps, les fibres sont jointives à l'intérieur d'un faisceau. La coloration est bonne.

- 4 jours de fixation :

La fixation est inégale, quelques fibres sont bien conservées. La dissociation est assez marquée, aussi bien en ce qui concerne la dissociation des faisceaux que celle des fibres à l'intérieur des faisceaux. La coloration est bonne.

f/ Alcool-Acide acétique

- cas du porc la fixation est généralement bonne. Elle nous est apparue toutefois inégale dans sa qualité, même pour des échantillons d'un même muscle (dans certains cas - rares -, la fixation est médiocre, analogue à celle observée avec le mélange Formol-alcool-acide acétique)

La dissociation est très variable et dépend de la taille des échantillons considérés. Dans le cas de petits échantillons (3 à 4 mm d'épaisseur), faisceaux et fibres sont absolument jointifs. Pour des échantillons un peu plus gros, les faisceaux tendent à se séparer les uns des autres, alors que les fibres restent, elles, parfaitement jointives à l'intérieur de chaque faisceau.

La coloration est presque toujours intense. Elle est quelquefois inégale, certaines zones prenant mal l'éosine.

- cas du boeuf Les observations sont les mêmes que dans le cas du porc. Il faut toutefois noter que pour de gros échantillons (7 mm d'épaisseur et plus), la qualité des préparations est moins bonne (dissociation des faisceaux, fixation insuffisante des fibres).

g/ Zenker

Les observations faites sur le porc et sur le boeuf sont identiques : la fixation est mauvaise, la dissociation des faisceaux et des fibres très marquée. La coloration est bonne.

h/ Subliné acétique

Dans l'ensemble, la fixation du tissu conjonctif est bonne, celle des fibres musculaires satisfaisante, mais inégale (contraction du cytoplasme des fibres). L'état de dissociation est variable ; le plus souvent, toutefois, les fibres sont dissociées (vraisemblablement à la suite de la rétraction de leur cytoplasme). La coloration est bonne.

i/ Gilson

La fixation des fibres est très inégale (légère contraction du cytoplasme), mais celle du tissu conjonctif est bonne et régulière. Les faisceaux sont peu ou pas dissociés. A l'intérieur des faisceaux, la dissociation des fibres est assez faible. Mais, en aucun cas, on n'obtient une cohésion des fibres musculaires analogue à celle observée avec la fixation par l'alcool-acide acétique. Il est toutefois très important de noter que, à la différence de ce qui se passe pour l'alcool-acide acétique, il est possible d'étudier dans de bonnes conditions (quant à la dissociation) des échantillons assez importants (8 à 10 mm d'épaisseur).

DISCUSSION -

De l'ensemble des observations recueillies, il apparaît que, parmi les fixateurs étudiés, deux seulement présentent un intérêt certain pour l'étude de la structure musculaire. Ce sont les mélanges alcool-acide acétique et Gilson. Ces deux fixateurs ont d'ailleurs une composition assez voisine.

Les différences enregistrées entre les deux, en ce qui concerne la fixation des fibres et du conjonctif et en ce qui concerne la dissociation des faisceaux, amène à préconiser l'emploi du premier dans les études portant plus spécialement sur l'organisation interne des faisceaux et sur la taille des fibres musculaires. Toutefois, il paraît indispensable, avec ce fixateur, de n'étudier que de petits échantillons (4 mm. d'épaisseur maximum). Le mélange de Gilson paraît s'imposer pour l'étude de l'organisation générale du muscle (forme, aspect, taille des faisceaux) et l'étude de la répartition et de la structure du tissu conjonctif.

Nous devons ajouter que ces deux fixateurs sont compatibles avec les techniques de coloration du muscle et du tissu conjonctif autres que l'hémalum-éosine. Ceci renforce en particulier l'intérêt du mélange de Gilson pour les études portant sur le tissu conjonctif.

Un point important qui se dégage de cette étude est la mauvaise qualité des préparations obtenues par fixation au formol. Contrairement à ce qui a été prétendu, le formol (aux deux concentrations étudiées) apparaît comme un mauvais fixateur, incapable notamment de permettre de bonnes études topographiques. Ce fait est d'autant plus grave qu'en raison de la commodité de son emploi, le formol a été largement utilisé dans l'histologie musculaire, spécialement dans les études sur la taille des fibres musculaires.

RESUME -

Différents fixateurs du tissu musculaire ont été étudiés sur des muscles de porc et de boeuf : Formol, Formol-alcool-acide acétique, Carnoy, Zenker, Bouin à l'eau, Alcool-acide acétique, Sublimé acétique, Gilson. Les caractères observés ont été la facilité de coupe, la qualité de la fixation, l'état de dissociation des faisceaux et des fibres, l'aptitude à la coloration. Seuls le mélange Alcool-acide acétique et le mélange de Gilson donnent de bons résultats, constants. Le mélange de Gilson semble intéressant pour les études relatives à la structure du muscle et à la répartition du tissu conjonctif. Le formol, étudié à différentes concentrations et à divers temps de fixation, a donné des résultats très médiocres.

SUMMARY - "A critical study of different fixatives of muscular tissue".

Different fixatives of muscular tissue have been studied : Formaline, Formaline-Alcohol-Acetic acid, Carnoy, Zenker, Bouin, Alcohol-acetic acid, Gilson. Observations were made on the fixation, on the dissociation of bundles and fibers and on the quality of the coloration. Gilson's fluid and Alcohol-acetic acid were the only fixatives which gave good results. Gilson's fluid seems to be specially suited for studies on muscle structure and distribution of connective tissue. Formaline, used at various concentrations, gave very bad results.

(1) JOUBERT D.M. - J. of Agric.Sci. 1956, 47, 59-102

(2) VAN GILS J.H.J. - Histological changes in muscles throughout insufficient diet.
4ème Réunion des Instituts de Recherches sur la Viande, Cambridge 1958