

CONSEQUENCES HISTOLOGIQUES ET COMPORTEMENTALES DE LESIONS (par laser) DU GANGLION SUS-OESOPHAGIEN DE L'ARAIGNEE (ARANEUS DIADEMATUS CL.)

LE GUELTE (L.), et WITT (P.N.)

*Laboratoire de Psychophysiologie,
Faculté des Sciences, Nancy*

Résumé

Trente six araignées femelles adultes (*Araneus diadematus*) qui avaient construit, dans les conditions constantes du laboratoire, au moins quatre toiles orbiculaires, ont été soumises à l'impact d'un faisceau laser d'énergie, de longueur d'onde, et de diamètre connus. L'analyse histologique du céphalothorax révèle des lésions profondes et circonscrites dans le ganglion sus-oesophagien des 12 animaux. Ces mêmes sujets manifestent des troubles graves et persistants dans leur comportement, et on peut les mesurer d'après les changements importants de la taille et de la régularité des toiles qu'ils filent ensuite. Les auteurs croient que les corrélations entre l'analyse histologique des lésions causées par le laser et l'évaluation des mensurations de la toile avant et après ces lésions chez *Araneus* fournissent un moyen d'étudier les rapports entre les structures et les fonctions dans le système nerveux des invertébrés.

Summary

Thirty-six adult female spiders (*Araneus diadematus* Cl) which had built under constant laboratory conditions at least four orb webs, were subjected to the impact of a laser beam of known energy, wave length, and focal size.

Histological analysis of the cephalothorax revealed deep, circumscribed lesions in the supra-

esophageal ganglion of 12 animals. The same animals manifested severe and persistent behavioral disturbances afterwards, which could be measured as significant changes in size and regularity of post-laser webs. The authors believe that correlation of histological analysis of laser damage with evaluation of web measurements before and after lesions in *Araneus* provides a means of studying structure-function relationships in the nervous system of invertebrates.

Zusammenfassung

36 adulte Spinnenweibchen (*Araneus diadematus* Cl), die unter konstanten Laboratoriumsbedingungen mindestens vier Netze gebaut hatten, wurden der Wirkung eines Laserstrahls mit bekannter Energie, Wellenlänge und Brennweite ausgesetzt.

Bei der histologischen Untersuchung des Cephalothorax konnten tiefe, örtlich begrenzte Läsionen im supraoesophagen Ganglion von 12 Tieren festgestellt werden. Diese Tiere zeigten starke, anhaltende Verhaltensstörungen, die in signifikanten Veränderungen der Grösse und Regelmässigkeit der Netze nach der Laserbehandlung zum Ausdruck kam. Die Autoren sind der Ansicht, dass die Untersuchung der Beziehung zwischen den histologisch feststellbaren Laserbeschädigungen und den Netzmassen vor und nach den Läsionen bei *Araneus* ein Mittel zur Erforschung der Struktur-Funktionsbeziehungen im Nervensystem der Invertebraten darstellt.

INTRODUCTION (1)

Dans l'étude des conséquences de lésions du système nerveux central (SNC), il est rare que la lésion et le comportement soient en même temps évalués qualitativement et quantitativement. Le problème, au point de vue histologique, peut résider dans la difficulté de mesurer exactement l'étendue d'une destruction des tissus. Il réside également dans le fait que la cible est parfois une structure plus ou moins polymorphe de grandes dimensions et qui peut être seulement évaluée grossièrement. Le comportement est souvent très facilement supprimé après lésion. Il peut ne pas être suffisamment rigide pour permettre une analyse quantitative ou être trop simple pour permettre une évaluation de la nature des divers désordres occasionnés par les lésions. L'Araignée construisant une toile géométrique possède un système nerveux hautement centralisé qui comprend un nombre relativement faible de cellules si on le compare au système nerveux des Vertébrés. Des recherches antérieures sur l'anatomie et l'histologie du système nerveux central des Arachnides par Babu (1965), Meier (1967) et Le Guelte et Witt (1968) nous ont fourni les connaissances nécessaires sur la structure « normale » du cerveau de l'Araignée.

Le laser a été employé chez d'autres Invertébrés, en particulier sur des Crustacés (Balesdent, 1968), cependant, aucun travail de ce genre n'a été réalisé sur l'Araignée, matériel particulièrement difficile à opérer (Legendre, 1958). Ces travaux et ceux d'autres auteurs, ont montré que l'énergie importante fournie par le rayon laser est un outil utile pour la microchirurgie chez les Invertébrés, mais

rien ne permet de prévoir, à ce jour, la nature et l'étendue possible d'une lésion chez *Araneus diadematus*. Notre travail se présente donc comme une première tentative pour établir si la chirurgie à l'aide du laser est adéquate pour notre animal et nous souhaitons qu'il ouvrira la voie pour une microchirurgie plus fine.

La structure des toiles et leurs variations utilisées comme indications de l'aptitude de l'animal normal à s'adapter à des traumatismes chimiques ou mécaniques, et l'évaluation de la plasticité du comportement, ont été l'objet de recherches dans les laboratoires des deux auteurs depuis plusieurs années. On a pu ainsi montrer que, même chez des animaux qui sont gravement handicapés, un certain type de construction est mis en œuvre, et que des toiles mesurables sont construites. La construction de la toile est une nécessité si impérative pour la survie de l'animal qu'elle peut être difficilement éliminée. Elle est aussi suffisamment complexe pour permettre une différenciation entre des changements de différentes natures : l'espacement régulier des rayons, par exemple, peut être modifié sans qu'il y ait de variations dans la régularité des spires et les dimensions. D'autre part, la taille de la toile peut être modifiée, par une substance tranquillisante par exemple, sans changement dans sa régularité.

Ces considérations nous ont amené à penser que les lésions, au laser, du S.N.C. de l'Araignée, pourrait fournir un bon modèle pour l'étude des interrelations entre structure nerveuse et fonction ; cet article est une étape dans une série où les auteurs utiliseront l'Araignée comme modèle pour l'étude du comportement et de son codage.

MATERIEL

Les lésions ont été localisées sur 36 Araignées, parmi celles qui tissèrent un

(1) Les travaux rapportés ici ont été effectués dans le laboratoire du Dr Witt, Department of Mental Health, Division of Research, Raleigh, N.C. — U.S.A.

ce sont toutes des femelles adultes. 14 se sont révélées avoir des lésions au niveau du ganglion sus-œsophagien (position C3, voir Le Guelte et Witt, 1968). Deux de celles-ci n'ont montré aucun changement dans la toile après la lésion qui était très superficielle. Les 12 autres sont étudiées ici.

Le laser utilisé est un laser à rubis de 6 934 angströms, avec une énergie de 0,8 à 1 joule. Il était focalisé sur la chitine à l'aide d'un microscope puis la mise au point était descendue de 0,5 mm (Witt, 1969). Pendant l'opération, l'Araignée était maintenue sur un support recouvert de gaze, ce qui permet une visée du céphalothorax. La position de l'ensemble était réglée grâce à un micromanipulateur.

METHODES HISTOLOGIQUES

Nous avons d'abord apprécié le nombre total de cellules nerveuses en les comptant toutes les trois sections, l'épaisseur de

nombre de toiles suffisant avant lésion, chaque coupe étant de 6 microns et le diamètre moyen d'une cellule de 20 microns. Dans ces conditions de mesure, le nombre de cellules accessibles à l'aide du laser, par la face supérieure de l'animal, est d'environ 6 000 sur un total de 15 000 cellules environ pour l'ensemble des ganglions sus et sous-œsophagiens.

La recherche des lésions est faite sur coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine. D'autres colorations (imprégnation argentique ou thionine) ne nous ont pas apporté de meilleurs résultats.

La lésion est repérée grâce à la coloration plus dense des noyaux au-dessous de la cuticule brûlée. Comme les animaux étaient fixés deux semaines après l'opération, nous admettons que les cellules à noyaux détruits étaient les seules à ne plus être fonctionnelles. Leur nombre est évalué sur les coupes par comptage au microscope.

Figure 1

Système nerveux central d'*Araneus diadematus* - Vue générale - Coupe sagittale.

Gg 1 : ganglion sus-œsophagien

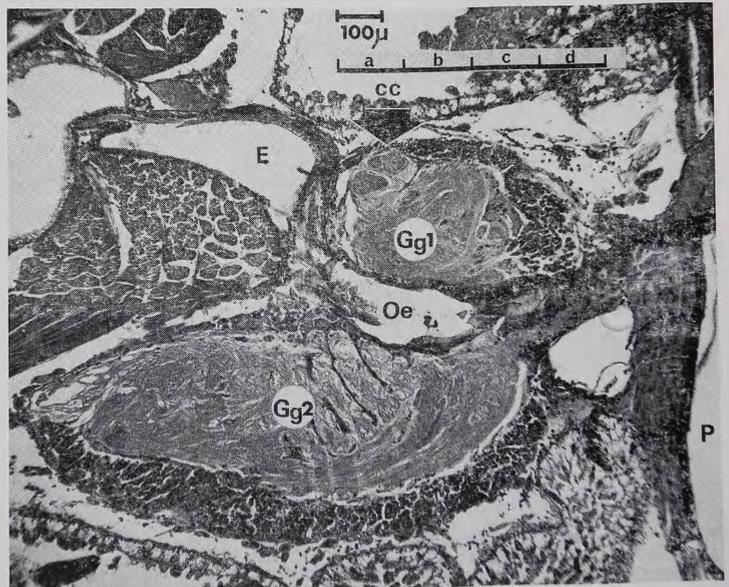
Gg 2 : ganglion sous-œsophagien

CC : corps central

Oe : œsophage

E : estomac

P : pharynx.



La figure 1 permet de localiser l'emplacement des différentes lésions et de noter la répartition des neurones près du niveau de l'oesophage (coupe sagittale médiane).

tres étaient mesurés dans la toile et leur comparaison avant et après lésion était réalisée à l'aide du test T de STUDENT et du χ^2 . L'ensemble des mesures était récapitulé sur cartes analysées par un ordinateur IBM 1620-1311. La figure 2 montre comment une toile d'*Araneus diadematus* est enregistrée par l'ordinateur (WITT et coll. 1968). Cette méthode a permis de détecter des changements dans la taille, la régularité, la forme et la structure fine de la toile, ceci indique quelle fonction est perturbée chez l'Araignée constructrice. Par exemple, une production normale de soie et de petites toiles observées après absorption d'une drogue tranquillisante sont la preuve d'une modification du comportement de construction. Par contre, une production réduite de soie et de petites toiles après absorption d'atropine indique que la réduction de la synthèse des polypeptides est le premier impact de la drogue.

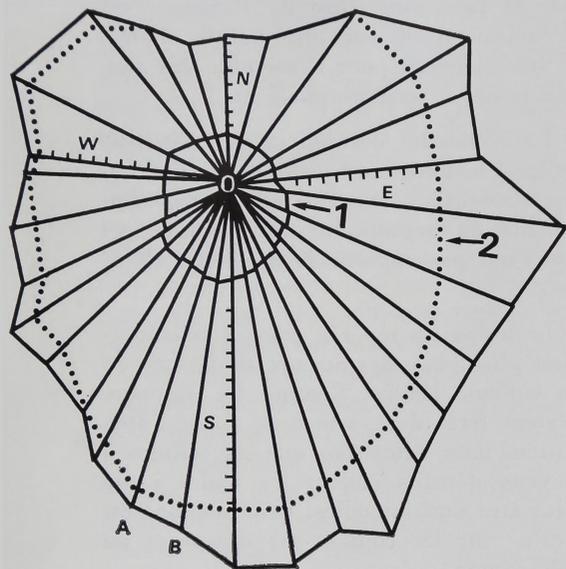


Figure 2

Mesures effectuées sur la toile en vue de l'évaluation statistique des modifications provoquées dans la toile par la lésion.

1 — Spirale caprice la plus interne délimitant la zone libre, intérieurement.

2 — Spirale caprice la plus externe délimitant la surface caprice.

N — Rayon supérieur sur l'axe vertical.

S — Rayon inférieur sur l'axe vertical. Le rapport N/S détermine le quotient d'excentricité de la toile.

W et E — Rayons horizontaux dont le rapport détermine le quotient d'excentricité horizontal de la toile.

Sur les rayons N, S, W, E, la distance des spires (en traits courts ici) par rapport au moyeu O est mesurée et permet les calculs de régularité des spires (Voir WITT et coll. 1968).

A O B — Angle entre 2 rayons (AO et BO).

MÉTHODES D'ÉTUDE DU COMPORTEMENT

Au moins 4 toiles étaient obtenues avant de soumettre les Araignées au laser et 5 toiles après. Vingt-sept paramè-

RÉSULTATS

A — Conséquences histologiques de la lésion au laser.

a) Traces superficielles de la lésion

Sous l'effet du rayonnement laser, la chitine est brûlée et le rayon est réfléchi en partie, ceci augmentant considérablement la dimension de la zone modifiée. Le céphalothorax étant coloré par des pigments hypodermiques, l'énergie du rayonnement est absorbée en grande partie par la chitine. Il se forme une auréole qui brunit progressivement au bout de quelques jours. Après deux semaines, quand les animaux sont sacrifiés, on remarque au-dessous de la chitine nécrosée une zone plus sombre formée par les tissus sous-jacents l'ancienne chitine qui sont inclus entre l'ancienne et la nouvelle chitine (fig. 3). La nouvelle chitine a été secrétée par des cellules hypodermi-

ques qui ont remplacé celles de la zone détruite. En effet, l'hypoderme sous la chitine brûlée, a été également détruit comme l'indiquent les coupes pratiquées sur des animaux fixés un ou deux jours après l'opération.

b) Dégats en profondeur

En profondeur, l'analyse histologique permet de constater une atteinte des noyaux de la partie supérieure du ganglion sus-oesophagien (comparer les figures 4 et 5 aux figures 6 et 7). La région lésée est caractérisée par de petits noyaux constituant une seule tache au milieu de la cellule alors que les noyaux environnants sont plus clairs et que les pigments y sont distribués en grains moins colorés. On doit noter qu'il existe, à l'état normal, des cellules à peu près identiques au point de vue taille et allure du noyau (cellules de type A selon BABU, 1965), mais ces cellules sont dispersées au niveau du ganglion sus-oesophagien parmi des cellules de type B de 20 microns de diamètre dans lesquelles la chromatine est sous forme de granulations.

Le rayon laser utilisé lors des expériences était focalisé pour avoir en surface un diamètre d'environ 7 microns (WITT, 1969), mais, après mise au point sur la chitine, le foyer de l'objectif était descendu de 0,5 mm de sorte que la zone nécrosée superficiellement atteint des dimensions de 500 microns. A la partie supérieure du ganglion sus-oesophagien, qui se trouve à environ 0,75 mm au-dessous de la chitine et qui est localisé grâce à un quadrillage de la surface externe du céphalothorax - Zone C 3, (LE GUELTE et WITT, 1968) la lésion a un diamètre de 80 à 100 microns.

Nous avons constaté que l'extension de la lésion au niveau des neurones sus-oesophagiens n'est pas liée à la puissance du rayon laser utilisé. La traversée des

tissus sus-jacents, plus ou moins colorés, absorbants plus ou moins l'énergie, est responsable des différences dans la gravité des lésions pour des conditions expérimentales identiques.

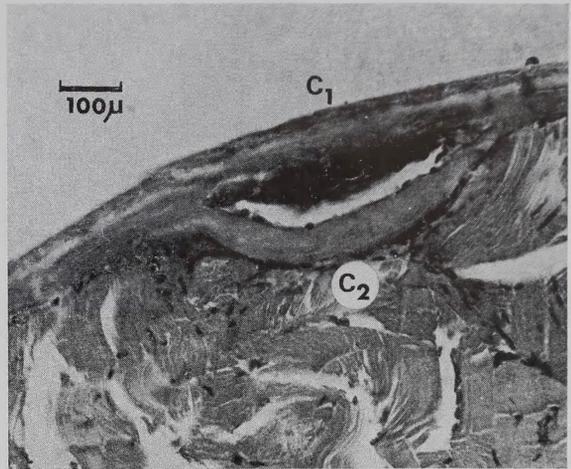


Figure 3

Aspect superficiel d'une lésion. Coupe sagittale.

C 1 : ancienne cuticule
C 2 : nouvelle cuticule.

B — Conséquences comportementales.

Toutes les araignées qui ont construit un nombre de toiles suffisant pour l'évaluation statistique après lésion, et qui ont des lésions profondes en C 3, montrent des changements significatifs dans la structure de la toile quand on compare les toiles d'un même animal avant et après lésion. Aucune des Araignées subissant le même protocole opératoire, mais ne recevant pas le rayonnement laser, ne présente de changement dans la toile. On en conclut que les changements comportementaux sont liés à l'exposition au laser.

La position de la lésion joue un rôle essentiel dans la modification du compor-

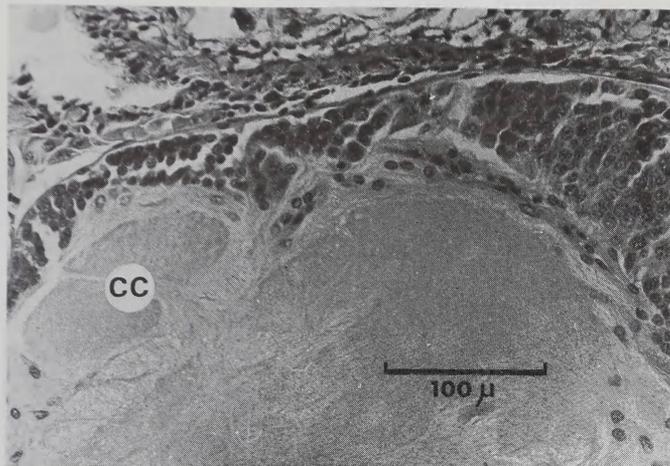


Figure 4
Coupe sagittale de cerveau non lésé
Région postérieure (C 3 a) — CC corps central.

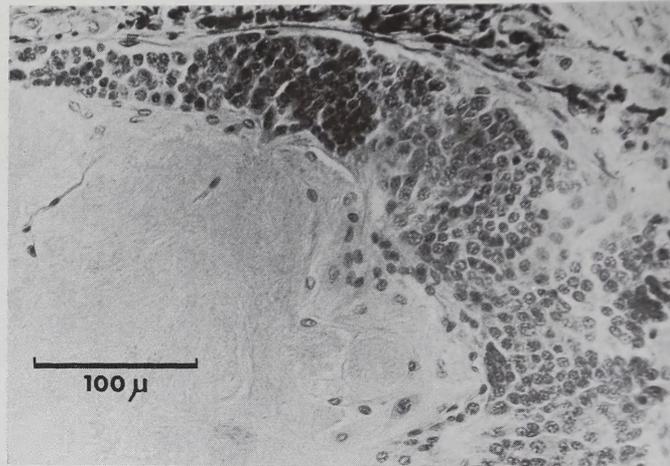


Figure 5
Coupe sagittale de cerveau non lésé
Région antérieure (C 3 d)

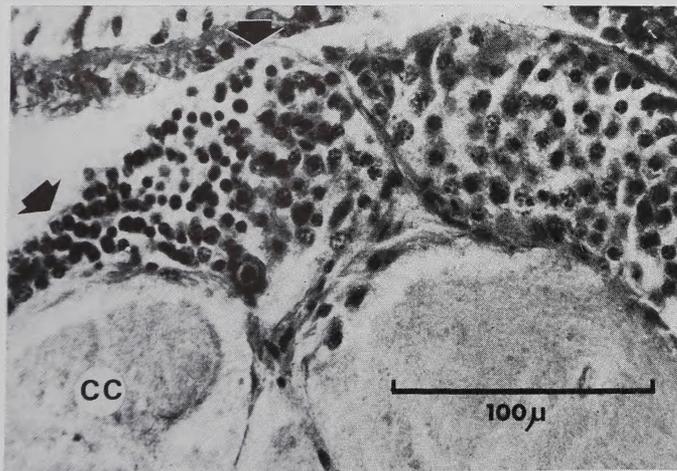


Figure 6
Coupe sagittale de cerveau lésé
Région postérieure (C 3 a)

Les flèches indiquent
l'emplacement
des cellules lésées

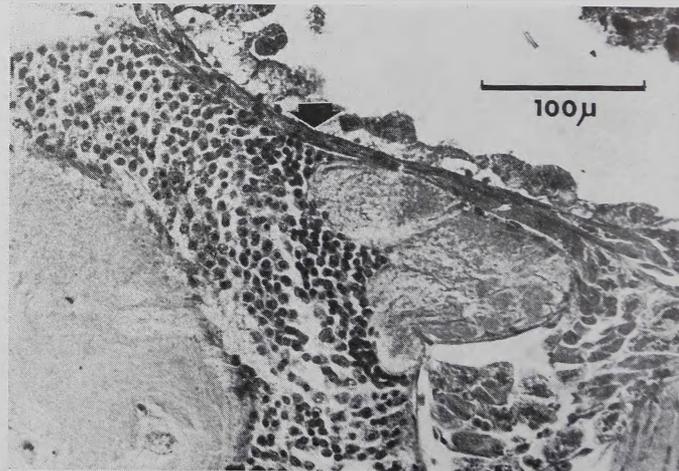


Figure 7
Coupe sagittale de cerveau lésé
Région antérieure (C 3 d)

tement. Chaque fois que la lésion est profonde et en C 3, un changement de structure est observé dans la toile. Ceci contraste avec le résultat obtenu avec 22 Araignées où les lésions sont en dehors de la zone C 3. Parmi celles-ci, seules 14 Araignées construisent des toiles perturbées. La probabilité d'une telle modification de structure après lésion en C 3 est significativement plus élevée que pour des animaux avec des lésions situées en une autre région ($\chi^2 P < .01$). De plus, il y a une plus grande cohésion dans les changements occasionnés par les lésions en C3 que dans l'autre groupe.

Comme nous n'avons pas déterminé avec précision la position des lésions hors de la Zone C 3, nous ne pouvons qu'envisager la cause possible des changements occasionnés dans la toile. Par exemple, l'estomac pourrait être lésé dans sa fonction ce qui entraînerait un déficit alimentaire et, en conséquence, des toiles plus petites (WITT 1963). D'autre part, les muscles, ou les attaches des muscles, pourraient être atteints et la fonction d'une ou de plusieurs pattes altérées. Connaissant le rôle important des premières paires de pattes en particulier (REED et coll. 1965 ; LE GUELTE, 1965), cette éventualité n'est pas à écarter. Actuellement, nos données ne nous permettent pas une analyse plus poussée de ces résultats.

De nombreuses Araignées ne construisent aucune toile après lésion en C 3. Le nombre relativement restreint d'observations sur la fréquence de construction après laser ne permet pas l'évaluation de cette donnée, mais semble indiquer une diminution après lésion en C 3.

Le tableau ne donne les résultats que pour les changements dans les paramètres de la toile significative à $P < .01$ (test de Student). Cependant, toutes les toiles construites par des Araignées lésées en

C 3 présentent des différences par rapport aux toiles avant lésion, dont beaucoup ne sont pas hautement significatives. La toile après lésion est toujours plus circulaire qu'avant l'opération (la forme ovale est modifiée par diminution de l'axe vertical), les rayons sont significativement moins nombreux et les spirales sont plus irrégulièrement posées. Les toiles sont plus petites, construites avec une

Araignée	Position de la lésion (voir Fig 1)	Nombre de cellules lésées	conséquences comportementales
D 3 237	C 3 d	65	nombreux changements significatifs à $P < .02$ pas de changement à $P < .01$
D 4 14	C 3 c	95	diminution du nbre de rayons (27/22), du nombre de spires (31/22), régularité angulaire (3,2/2,7), régularité des spires 0,8/1,3.
D 4 23	C 3 d	60	surface de la zone libre (31/20), surface d'une maille (76/48) $\frac{1}{2}$
D 4 32	C 3 d	50	nombre de rayons 34/18 Nombre de spires 37/19 régularité angulaire 3,01 / 8,30
D 5 18	C 3 a	120	pas de toile après lésion
D 5 23a	C 3 a	150	rayons 21,8 : 16,0 angles 6,18 / 0,65 régularité angulaire 5,37/11,82
D 5 26a	C 3 a	50	spires E 28/22 surface caprice 376/279 cm ² surface zone libre 39/29 cm ² longueur de fil 16/12m Diminution du nombre de rayons
D 5 42	C 3 c	55	spires E 27/20 surface caprice 20/310 cm ²
D 5 47	C 3 c	155	nombre de toiles insuffisant pour évaluation statistique
D 5 50	C 3 a	80	quotient d'excentricité 0,91/0,73 régularité angulaire 3,43/4,67
D 5 61	C 3 a	160	angle médian 15°/13° régularité angulaire 4,79 / 3,88
D 5 86	C 3 c	250	nombre de spires 19/12 surface de la zone libre 38/18 cm ²

Seules les différences significatives à $P < .01$ sont indiquées.

longueur de fil inférieure et ont une surface caprice plus restreinte.

Bien que les variations dans la gravité des modifications de la toile soient importantes d'un animal à l'autre, un changement observé dans la première toile après lésion chez un animal donné reste constant tout au long du reste de la période d'observation pour cet animal.

DISCUSSION

Dans ces expériences, nous obtenons des dégâts très comparables pour diffé-

rentes positions de la lésion dans le SNC (voir tableau). Ceci s'oppose aux résultats obtenus grâce à l'action de drogues. On sait, en effet, que chaque drogue produit un effet spécifique.

Les lésions affectant la zone du Corps central (C 3 a) ne sont pas seules à modifier le comportement de construction. On sait (MEIER, 1967) que cette région est, au point de vue structural, une zone de liaison entre fibres sensibles en provenance des pattes locomotrices et fibres motrices pour les mêmes appendices. Les cellules plus antérieures (C 3 b, c, d,) ne jouent pas de rôle dans la coordination des mouvements des pattes. La lésion des fibres cheminant en dessous de ces cellules, fibres provenant du Corps Central, pourrait aussi avoir une importance dans la création des désordres de la toile. Sans envisager une localisation fonctionnelle des cellules nerveuses, on peut toutefois constater que les lésions au niveau C 3, c perturbent la pose des spirales caprices (déplacement circulaire de l'Araignée en fin de toile) alors que les lésions en C 3, a (corps central) intéressent en plus la pose des rayons (déplacements linéaires de l'Araignée au début de la construction).

Le nombre des cellules visiblement détruites se situe entre 0,9 et 4 % du nombre total des cellules du ganglion susoesophagien. D'après les résultats que nous obtenons sur les 12 Araignées avec lésion en C3, une relation entre le nombre de cellules lésées et la gravité des désordres n'est pas mise en évidence. La position de la lésion au niveau du corps central lui-même revêtirait une grande importance. Il serait alors possible d'envisager, pour cette zone du S N C, un rôle prépondérant de centre coordinateur sensori-moteur qui régulerait des éléments de comportement moteur grâce aux informations sensibles y arrivant. Ce qui serait conforme à sa structure histologique déjà connue.

Acknowledgements

During the long years of experimentation we had the efficient help of Dr. Frank K. Tittel from the Department of Electrical Engineering, Rice University, Houston, Texas, and Dr. Charles F. Reed, Department of Psychology, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania. The work would not have been carried out without the valuable support from a grant of the National Science Foundation and the support from the North Carolina Department of Mental Health, Division of Research.

Bibliographie

- BABU (S.K.), 1965. — Anatomy of the central nervous system of Arachnids. *Zool. Jb. Anat.* 82, 1-154.
- BALESDENT (M.L.), 1968. — Microchirurgie par rayonnement laser : travaux réalisés sur le crustacé isopode *Asellus aquaticus* L. *Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci.* 7, 1, 82-92.
- LE GUELTE (L.), 1958. — Contributions à l'étude du système nerveux des Aranéides. *Ann. Biol.* 34, 5-6, 194-223.
- LE GUELTE (L.), 1965. — Répercussions de la perte de pattes sur la construction de la toile chez *Araneus diadematus* et *Zygiella x-notata* (Araignées, Argiopidae). *Psychol. Fr.* 10, 3, 257-264.
- LE GUELTE (L.) et WITT (P.N.), 1968. — Données morphologiques permettant de localiser sur l'animal vivant les différentes régions du système nerveux central de l'Araignée argiopide *Araneus diadematus* Cl. soumise à des lésions par action du laser. *Bull. Mus. Nat. Hist. Nat.* 40, 4, 742-744.
- MEIER (F.), 1967. — Beiträge zur Kenntnis der postembryonalen Entwicklung der Spinnen Araneida Labidognatha unter besonderer Berücksichtigung der Histogenese des Zentralnervensystems. *Rev. Suisse Zool.* 74, 1, 127 p.
- REED (C.F.) WITT (P.N.) et JONES (R.L.) 1965 — The measuring function of the first legs of *Araneus diadematus* Cl. *Behaviour*, 25, 12, 98-119.
- WITT (P.N.) 1963. — Environment in relation to behavior of Spiders. *Arch. Environ. Health* 7, 4-12.
- WITT (P.N.), REED (C.F.) PEAKALL (D.B.), 1968. — A spider's web, problems in regulatory biology. Springer Verlag. Heidelberg. 107 p.
- WITT (P.N.) 1969. — Behavioral consequences of Laser lesions in the central nervous system of *Araneus diadematus* Cl. *Am. Zool.* 9, 121-131.