

SUR L'EMPLOI DE L'HÉMATOXYLINE FERRIQUE DE REGAUD POUR L'ÉTUDE DE LA GARNITURE CHROMOSOMIQUE CHEZ LES CHAETOGNATHES

par Jean ARNAUD

Matériel d'étude et but des recherches.

Les essais ont porté sur cinq espèces de Chaetognathes récoltées dans le golfe de Marseille : *Sagitta bipunctata* et *S. inflata* surtout, puis *S. minima*, *S. friderici*, *S. lyra*.

Les colorations ont été pratiquées sur les organes génitaux et particulièrement sur le testicule, en vue du dénombrement des chromosomes dans le groupe. Pour de telles recherches existent, on le sait, des méthodes d'écrasement; mais celles-ci compromettent gravement l'ordre cellulaire et, souvent même, déplacent une partie du contenu nucléaire dans une cellule voisine. Aussi les colorations sur matériel fixé et coupé au microtome s'avèrent-elles également nécessaires, d'une part pour l'étude topographique de l'organe, d'autre part en tant que matériel de référence et doivent-elles donc être menées parallèlement au "squash". J'ai été ainsi conduit à faire de nombreux essais pour choisir, parmi les colorations les plus électives, celles qui donnaient avec la chromatine, le grain le plus fin chez les Chaetognathes (pl. I en annexe).

Intérêt de l'hématoxyline ferrique de Regaud.

L'hématoxyline, produit de choix pour la coloration nucléaire d'un matériel préalablement fixé, convient parfaitement aux Chaetognathes. Celle de Heidenhain est à l'ordinaire la plus employée et notamment par GHIRARDELLI dont de nombreux travaux concernent l'histologie chez les Chaetognathes (1954, 1959, 1961).

L'hématoxyline ferrique de Regaud, par contre, est fort peu utilisée à cet usage. Cependant, tout en colorant aussi intensément et finement, elle présente sur la précédente quelques avantages que je voudrais noter ici.

Le vieillissement que demande toujours l'hématoxyline se produit plus vite : deux mois d'exposition à la lumière et la chaleur suffisent. Elle peut d'autre part être vieillie fort rapidement par utilisation sur coupes d'histologie courante ne requérant pas la même finesse, notamment dans le trichromique de Masson. Une centaine de coupes colorées à chaud suffisent, dans ce cas, pour parfaire toutes ses qualités.

Elle se prête davantage à une coloration rapide en étuve, sans que son altération en soit pour autant notablement accélérée. La différenciation qui suit s'en trouve également facilitée par la progressivité avec laquelle l'alun élimine l'excès de colorant en fin d'opération pour chacune des catégories cellulaires de la lignée séminale.

Elle permet enfin la coloration en masse qui, pour être plus délicate, favorise néanmoins l'inclusion des petits individus et l'étalement des coupes en donnant à l'objet une rigidité plus grande.

Détails pratiques de la manipulation.

1°) Fixation.

Le fixateur le plus avantageux pour cette coloration est certainement le Bouin et particulièrement le Bouin-Hollande très recommandé pour l'étude histologique du plancton qui doit

PLANCHE I

Les microphotographies ci-contre concernent des coupes qui ont été effectuées, selon la méthode exposée dans cette note, sur *Sagitta bipunctata*.

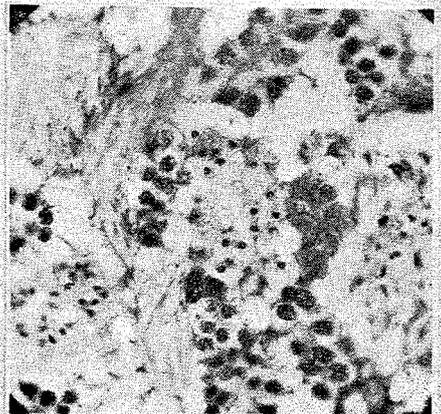
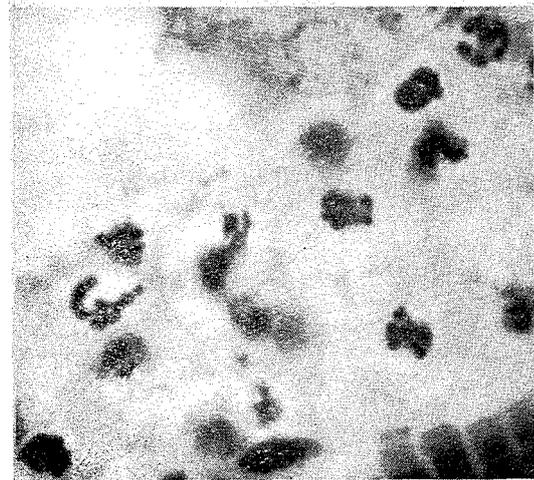
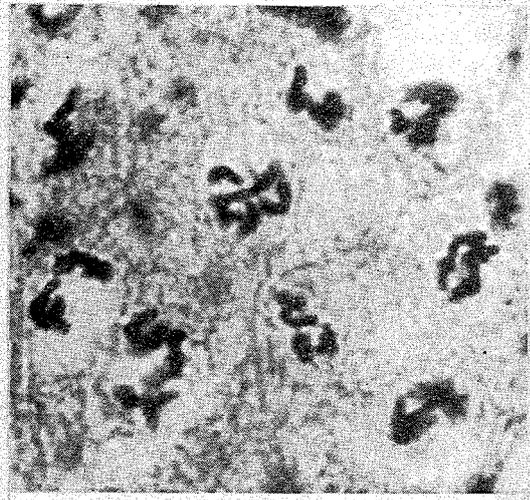
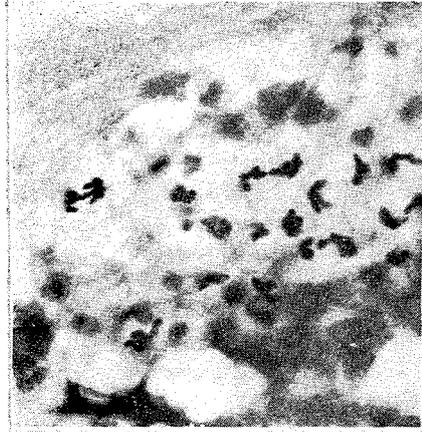
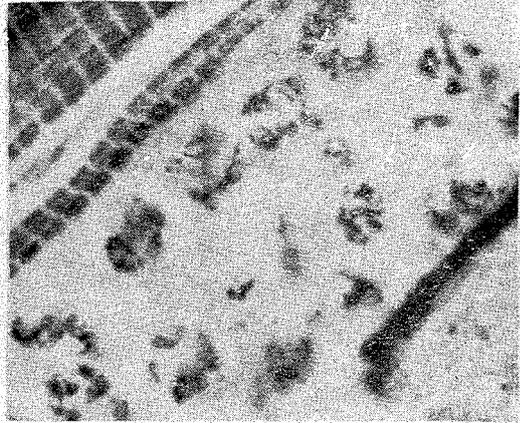
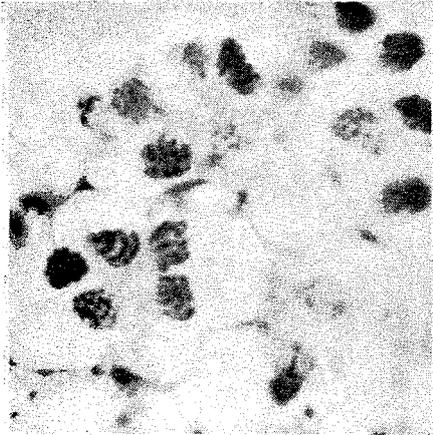
FIG. 1 (en haut, à gauche). — *Spermatocytes I en prophase* (x 1400). A gauche, on distingue les anses chromatiques à l'intérieur des noyaux encore constitués.

FIG. 2 (en haut, à droite). — *Spermatocytes I en fin de prophase*. Les chromosomes sont grêles, allongés et forment des chiasmats (x 1550).

FIG. 3 et 4 (au milieu). — *Deux aspects de la métaphase des spermatocytes I* (x 900 et x 1600). Les chromosomes doubles, très épais, forment des plaques équatoriales (légèrement différentes des figures classiques). Dans la fig. 3, à gauche, on remarque une cellule déjà en anaphase.

FIG. 5 (en bas, à gauche). — *Spermatocytes II en métaphase* (x 2350). Dans la cellule située en haut à droite on peut compter 9 chromosomes. Noter encore de nombreux spermatocytes où l'anaphase s'amorce et, dans l'un d'eux (au centre), 2 chromosomes déjà excentrés.

FIG. 6 (en bas, à droite). — *Spermatocytes II en fin d'anaphase* (au centre). Les chromosomes se sont regroupés aux pôles des fuseaux achromatiques (x 600).



parfois être ramené de croisières lointaines. En effet, si l'acétate de cuivre, en augmentant la solubilité de l'acide picrique, confère au liquide un pouvoir de pénétration plus grand et permet par conséquent des temps de fixation plus courts, inversement il accroît la stabilité du mélange où le matériel peut séjourner très longtemps. Ce fixateur laisse ainsi une liberté d'action appréciable au chercheur qui peut y conserver ses objets de quelques heures à trois mois pour certaines espèces comme *S. bipunctata* et *S. inflata*, sans altération aucune du matériel nucléaire. Il est cependant préférable de fixer un minimum de deux jours pour laisser aux tissus peu consistants le temps de se raffermir, ce qui facilitera grandement l'obtention des coupes, longitudinales notamment.

Pour la préparation du Bouin-Hollande, opérer la dissolution de l'acétate de cuivre par étapes plutôt qu'en une seule fois : pulvériser les cristaux dans un mortier puis y verser de petites quantités d'eau distillée que l'on recueillera successivement après avoir longuement malaxé la boue au pilon.

2^o) Coloration.

a) Mordancer durant 30 minutes à 56° dans l'alun de fer 3 % préparé à froid.

b) Colorer directement dans l'hématoxyline de Regaud (1), vieillie comme il a été dit, en faisant agir 30 minutes dans l'étuve à paraffine, ou mieux 2 heures et demie dans un grand bac à coloration en laissant refroidir la solution préalablement portée à 60°.

c) Différencier à froid dans l'alun de fer après un rinçage rapide à l'eau ordinaire. Si on l'emploie à concentration moyenne (3 %), on pourra le laisser agir 5 minutes dans une boîte à coloration sans risquer une différenciation trop grande.

Plonger ensuite les coupes dans l'eau courante. Celle-ci, comme pour la laque aluminique, ravive les teintes, mais il faudra près d'un quart d'heure pour obtenir un noir intense. Aussi pourra-t-on profiter de ce délai pour extraire une coupe après l'autre et terminer la différenciation de chacune avec quelques gouttes d'alun, en la surveillant au microscope, sous lamelle, avant de les replonger chacune, le temps nécessaire, dans l'eau courante. Ce double passage dans l'alun et l'eau calcaire facilite non seulement la manipulation, mais encore semble produire un grain plus fin.

Ajoutons, pour terminer, qu'une coloration cytoplasmique, quelle qu'elle soit, n'est pas souhaitable, car si elle souligne le contour cellulaire, elle voile par contre toujours un peu le contenu nucléaire et gêne ainsi l'observation.

Laboratoire de Biologie animale (Plancton) Faculté des Sciences. Marseille.

BIBLIOGRAPHIE

- GHIRARDELLI (E.), 1954. — Osservazioni sul corredo cromosomico di *Sagitta inflata* GRASSI. — *Scientia genetica*, **4** (4), p. 336-343, 6 fig.
— 1959. — L'apparato riproduttore femminile nei Chetognati. — *Rend. Accad., Naz.*, **40** (10), ser. 4, p. 1-46, 5 fig., 14 pl.
— 1961. — Istologia e citologia degli stadi di maturità nei Chetognati. — *Boll. Pesca, Piscicol. Idrobiol.*, **15**, n.s. (1), p. 5-19, 3 fig.

(1) Hématoxyline cristallisée (Geigy ou Fluka)	1g
Alcool à 95°	10cc
Glycérine	10cc
Eau distillée	s.q. pour 100cc
(Dissoudre d'abord l'hématoxyline dans l'alcool à 95°).	