

La Métachromasie au bleu de toluidine dans l'œuf d'*Artemia salina*

I. Aspect, distribution et origine des grains chromotropes M

par J. FAUTREZ et N. FAUTREZ-FIRLEFYN¹

Laboratoire d'Anatomie humaine et d'Anatomie comparée de la Faculté de Médecine de Gand

AVEC UNE PLANCHE

INTRODUCTION

Le plasme périnucléaire de l'œuf d'*Artemia salina* en segmentation présente une composition complexe. On y rencontre des granules et des éléments structurés d'aspect et de composition chimique très divers. Il est bourré d'un semis de très fins granules riches en ribonucléoprotéines et contenant également des protéines sulfhydrylées. Il se pourrait que leur aspect granuleux soit un artéfact de fixation et qu'il s'agisse plutôt de constituants du réticulum endoplasmique. Ils sont mêlés à des granules plus épais qui contiennent du glycogène et des protéines basiques (J. Fautrez & N. Fautrez-Firlefyn, 1959). Le plasme périnucléaire est en outre riche en mitochondries. Ces dernières sont facilement mises en évidence par la technique de Baker pour les phospholipines. Leur nature mitochondriale a d'ailleurs été confirmée par le fait qu'elles apparaissent en noir au microscope à contraste de phase et par leur aspect au microscope électronique. Disposées, au cours de l'interphase, en un gradient décroissant à partir de la membrane nucléaire, elles effectuent des déplacements au cours de la mitose, que l'une d'entre nous a décrit ailleurs (N. Fautrez-Firlefyn, 1960). Éparses parmi ces éléments, on rencontre de larges sphères hyalines que nous n'avons jamais pu colorer ni par des méthodes histologiques ni par des réactions cytochimiques. Ces sphères sont expulsées par le noyau, surtout au début de la prophase. Restent enfin des grains intensivement chromotropes, que l'on met aisément en évidence au moyen du bleu de toluidine. Ce sont ces derniers, qui nous ont longuement intrigués, que nous voudrions étudier ici de plus près.

Ces granules ne sont pas sans rappeler par certains caractères les granules chromotropes α et β , étudiés par A. Dalcq, J. Pasteels et par leurs collaborateurs dans les œufs de diverses espèces marines et de mammifères (cf. Dalcq, 1960, pp. 332 sqq.). Insistons cependant sur le fait que l'école bruxelloise a obtenu la métachromasie au bleu de toluidine *in vivo*. Sur notre matériel opaque, l'ob-

¹ Authors' address: Laboratoire d'Anatomie humaine et d'Anatomie comparée de la Faculté de Médecine de Gand, Bijlokekaai 1, Gand, Belgique.

servation sur le vivant est impossible sauf pour des éléments corticaux sur lesquels nous reviendrons ailleurs. Les grains que nous étudierons ici sont chromotropes dans les œufs fixés. Inversement il ne semble pas nettement établi si les granules α et β des auteurs bruxellois restent chromotropes après fixation.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous utilisons dans nos travaux une *Artemia salina* amphimixique diploïde d'origine californienne. A partir d'œufs enkystés que l'on trouve dans le commerce comme nourriture pour poissons d'aquarium, nous entretenons au laboratoire des cultures dans une eau salée à 30 pour mille.

Des femelles gravides sont fixées après décapitation afin de s'assurer d'une pénétration rapide du fixateur et coupées en série. Les coupes sont colorées au bleu de toluidine. Dans ces conditions la métachromasie obtenue ne dépend pas uniquement de la concentration et du pH de la solution colorée utilisée, mais également du fixateur employé. Pour le moment nous utiliserons les conditions optima pour l'apparition de la métachromasie, afin d'étudier plus spécialement l'aspect, la distribution et l'origine des granules chromotropes. Les animaux sont fixés à l'alcool-formol acétique (75+20+5) ou à l'alcool-formol salé (alcool 70 p.+formol salé de Baker 30 p.). La solution colorée est une solution aqueuse de bleu de toluidine à 1/5.000 à pH 5 à 5.8. Notons en outre que la technique de la coloration même a une grande influence sur le résultat. On obtient en effet une différenciation importante lors du passage par les alcools. C'est ainsi que le passage de l'eau dans les alcools à 70° et à 90° fait disparaître la métachromasie β (pourpre) de Michaelis (1947), et non la métachromasie γ (rouge). Pour obtenir des résultats comparables on doit porter les préparations sur une même lame porte-objet ou sur des lames traitées dos à dos. Comme les faits que nous décrivons ici ne peuvent être recueillis que dans un matériel très abondant, rassemblé au hasard de fixations différentes, cette méthode n'est pas toujours utilisable. Dès lors nous avons essayé d'éviter le passage par les alcools dilués; au sortir du bleu de toluidine les coupes sont essorées et plongées immédiatement dans l'alcool absolu. Dans ces conditions une étude comparative devient possible.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

1. *L'intercinèse au cours des premiers stades de la segmentation*

Nous examinerons d'abord les granules chromotropes M au cours des premiers stades de la segmentation; c'est à ce moment qu'on les retrouve le plus aisément. Au moment de l'intercinèse les granules M sont surtout épars dans le plasme périnucléaire. A partir du stade II la partie de ce plasme dirigée vers le centre du germe en est moins richement pourvue (Planche, fig. 9). Ces granules se présentent comme des structures complexes, dont la partie principale est une flaque irrégulièrement lancéolée, en forme de virgule ou de gros grain et présentant une métachromasie très intense. Accolés à cette flaque, on trouve un ou

plusieurs petits granules denses d'un bleu très sombre. Ces structures tranchent nettement sur le fond du plasme périnucléaire qui est légèrement pourpre (métachromasie β due au RNA).

Une étude plus approfondie permet en outre de trouver au sein du vitellus des éléments qui semblent à l'origine des grains chromatropes du plasme périnucléaire. Alors que la plupart des grains de vitellus se colorent de manière homogène et en une teinte orthochrome au bleu de toluidine, un assez grand nombre d'entre eux présente de petites vacuoles de forme ovoïde, non colorables et fortement réfringents (Planche, fig. 1). C'est au sein de ces vacuoles que s'accumule une substance, qui dès le début présente une métachromasie γ très prononcée, tandis que la plaquette vitelline diminue habituellement de taille tout en se colorant plus intensivement et en virant progressivement au bleu violacé (Planche, fig. 2). Puis les vacuoles confluent en deux ou trois grains rouges, tandis que les dimensions de la gaine violacée (métachromasie β) continuent à diminuer (Planche, fig. 3). Entre ces éléments que nous appellerons 'granules M jeunes' et les granules M mûrs du plasme périnucléaire (Planche, fig. 4) on peut trouver toutes les transitions. En étudiant la distribution topographique de ces diverses structures, on a d'ailleurs l'impression que cette évolution s'effectue en direction du plasme périnucléaire et qu'en 'mûrissant' les granules M migrent en direction du noyau.

2. *Évolution des grains chromatropes au cours de la maturation et de la segmentation*

Dans l'oocyte ovarien en accroissement cytoplasmique on ne trouve jamais de grains chromatropes. Ils font leur apparition en même temps que le vitellus. Lorsque les premières plaquettes vitellines se forment dans la partie centrale du germe, on peut observer de-ci de-là dans cet amas un petit granule chromatrope. Lorsque la vitellogénèse touche à sa fin, on rencontre ces éléments encore peu nombreux et généralement de petite taille irrégulièrement distribués dans tout le corps cellulaire. Il s'agit surtout d'éléments chromatropes 'jeunes': une coque ovoïde bleue ou violacée, contenant plusieurs granules rouges.

Il est à remarquer toutefois que dans les cellules vitellogènes, qui délimitent la cavité utérine, aucun granule M n'a jamais été mis en évidence.

Lorsque les œufs poursuivent leur maturation d'abord dans les sacs latéraux des oviductes, ensuite dans l'utérus, le nombre des granules chromatropes 'jeunes' augmente assez rapidement; leur distribution topographique reste la même jusqu'au moment de la copulation des pronucléi. Aucune concentration ne s'observe autour des mitoses de maturation (Planche, fig. 5). Ni le pronucléus mâle (Planche, fig. 6), ni l'aster spermatique (Planche, fig. 7) ne semble attirer spécialement les grains chromatropes.

En séparant des femelles très jeunes des mâles, il est possible d'obtenir des animaux mûrs mais vierges. Dans ces conditions les œufs mûrs descendent dans les sacs latéraux des gonoductes. C'est à cet endroit que, comme normalement

d'ailleurs, on les retrouve en métaphase de la première division de maturation. Comme les œufs ne sont pas fécondés, la maturation ne va pas plus loin, et les germes ne quittent pas le sac latéral vers l'utérus. De nouveaux oöcytes entrent cependant en vitellogénèse au niveau de l'ovaire: après quelque temps on obtient des femelles dont les sacs latéraux et les ovaires sont bourrés d'œufs, alors que l'utérus est vide. Dans ces conditions on constate également que les premiers grains chromotropes apparaissent en même temps que les premières plaquettes vitellines et que dans l'œuf en vitellogénèse descendu dans les sacs latéraux leur nombre accroît considérablement; il dépasse singulièrement celui que l'on trouve au même stade dans des femelles fécondées. Tout se passe comme si la production de grains chromotropes y continuait indépendamment du fait que la maturation y est bloquée au stade de la métaphase de la division réductionnelle.

Dans les œufs fécondés, un changement de distribution s'opère dès le début de la prophase de la première division de segmentation. Les granules M chromotropes 'mûrs' ont tendance à venir se grouper dans l'énorme aster qui se développe au contact des deux pronucléi accolés (Planche, fig. 8). Ces derniers ne confluent pas et à la métaphase I, comme à l'anaphase I, on se trouve en présence de deux fuseaux indépendants. Pendant ces périodes, on assiste encore à une légère augmentation du nombre de grains chromotropes rassemblés dans les asters et surtout à leur périphérie. Le reste du plasme périnucléaire n'en est pour autant pas dépourvu. On en trouve toujours au sein du vitellus; il s'agit ici essentiellement de formes 'jeunes'. Dès maintenant la morphologie des granules concentrés dans l'aire périnucléaire est donc nettement différente de celle des éléments épars dans le vitellus (cf. paragraphe 1).

À l'intercinèse des stades ultérieurs, la situation est celle que nous avons décrite sous le paragraphe 1. Au stade préprophasique la plupart des grains M mûrs vont se localiser aux deux pôles du noyau, zone dans laquelle les mitochondries vont également se concentrer, comme nous l'avons décrit antérieurement (Planche, fig. 10). À la métaphase (Planche, fig. 12) et à l'anaphase (Planche, fig. 11) on les trouve surtout à la périphérie des asters; quelques-uns s'observent cependant dans le reste du plasme périnucléaire.

Quant à la distribution des granules M au cours de la segmentation, nous n'avons pas remarqué qu'un des blastomères soit favorisé. D'un animal à l'autre, les œufs peuvent être plus ou moins riches en granules M. Ces variations sont-elles attribuables à des différences toujours inévitables dans la technique de fixation telles que la vitesse de pénétration du fixateur ou sont-elles réellement l'expression d'un état différent de la cellule? Nous espérons au cours de cultures d'œufs *in vitro* pouvoir éliminer le plus possible les variations dans les manipulations techniques.

À partir de la blastula âgée on a l'impression que le nombre de granules chromotropes diminue légèrement; ceci est particulièrement vrai pour ceux qui semblent néoformés au sein du vitellus. On en retrouve toujours dans l'aire périnucléaire, plus ou moins condensés aux pôles de la future mitose. C'est

ainsi qu'immédiatement avant la gastrulation, alors que les noyaux forment une couronne superficielle, la plupart des granules M mûrs sont situés de part et d'autre des noyaux, aux extrémités de l'axe dans lequel se situeront les fuseaux et qui est parallèle à la surface du germe. Rares sont les granules chromotropes jeunes distribués entre les grains du vitellus. Pendant la gastrulation enfin les éléments chromotropes se raréfient et finissent par disparaître complètement.

DISCUSSION

La coloration des œufs d'*Artemia salina* au bleu de toluidine a attiré l'attention sur la présence de granules M chromotropes situés tant dans le plasmé périnucléaire qu'entre les grains de vitellus. Une fois repérés, ils ont pu être retrouvés par d'autres colorations et notamment par des techniques histochimiques. Les résultats de cette dernière investigation feront l'objet d'une partie suivante de ce travail.

Les éléments les plus typiques se trouvent dans le plasmé périnucléaire et se concentrent à la périphérie des asters lors de la mitose. Ils se présentent comme une flammèche plus ou moins régulière à métachromasie γ , à laquelle est accolé au moins un grain bleu sombre. Mais entre le vitellus on trouve en outre des grains dont la taille est égale ou légèrement inférieure à celle d'une plaquette vitelline, et qui se colorent en bleu foncé, en bleu violacé ou en violet franc (métachromasie β) mais contiennent une ou plusieurs inclusions rouges (métachromasie γ). Toutes les transitions existent entre ces derniers grains et les éléments chromotropes du plasmé périnucléaire. Cette évolution semble être accompagnée d'une migration vers le plasmé périnucléaire, où l'on trouve les éléments les plus évolués.

A l'origine de cette évolution se trouve un grain de vitellus : les micro-vacuoles qu'on y observe, commencent par se remplir de la substance qui donne la métachromasie γ . Mais pour l'origine vitelline ne plaident pas seulement l'aspect et la localisation des plus jeunes éléments chromotropes. Lorsque l'on suit les œufs en maturation on est frappé de constater que jamais un oocyte, qui n'a pas encore ébauché sa vitellogénèse, ne contient de granules chromotropes. Par contre, dès que la vitellogénèse s'installe on voit apparaître entre les grains de vitellus les premiers éléments chromotropes jeunes.

Il semble bien que les grains chromotropes aient quelque chose à voir avec l'activité mitotique au cours de la segmentation. Les éléments les plus évolués ne se condensent pas seulement dans le plasmé périnucléaire, mais, lors des mitoses, plus en particulier à la périphérie des asters. Leur formation qui s'installe dès le début de la vitellogénèse, régresse sensiblement vers la fin de la segmentation. Leur origine à partir du vitellus pourrait peut-être faire supposer qu'ils apportent du matériel énergétique nécessaire aux mitoses successives.

Il est en outre assez curieux de constater que les mouvements des granules M du plasmé périnucléaire se synchronisent avec ceux des mitochondries, que l'une

de nous a décrit antérieurement (N. Fautrez-Firlefyn, 1960). La disposition des mitochondries autour du noyau interphasique est identique à celle des granules M. Elles se regroupent vers les pôles du noyau au moment du dédoublement du centre cellulaire, qui se retrouve toujours parmi elles, et s'éloignent ensuite dans des 'couloirs' bien délimités, du noyau prophasique pour se regrouper autour des centres. C'est en général dans ces aires mitochondriales que l'on retrouve le plus de granules M.

Si l'apparition des grains chromotropes semble se faire au moment où les mitoses vont se succéder normalement à un rythme rapide, il faut cependant observer que, si l'on arrête l'entrée en maturation (femelles vierges), la formation de grains chromotropes se poursuit de manière indépendante au sein du vitellus.

On peut enfin se demander si les granules chromotropes trouvés chez *Artemia salina* peuvent être homologués aux granules α et β décrits dans les œufs d'espèces variées par les embryologistes de l'école bruxelloise. Il est évident qu'à part leur caractère chromotrope, ils s'en rapprochent par une série de propriétés. Comme nous n'avons aucun renseignement sur leur comportement *in vivo* vis-à-vis du bleu de toluidine, il nous semble impossible de les homologuer sans plus. S'il est vrai que les grains jeunes trouvés parmi les plaquettes vitellines pourraient être rapprochés des grains α et les granules mûrs situés dans le plasme périnucléaire assimilés aux grains β , la situation chez *Artemia salina* serait, semble-t-il, assez exceptionnelle. Alors que les auteurs bruxellois insistent sur le fait que les granules α et β sont des entités nettement différentes, nous trouvons en effet chez *Artemia salina* tous les *stades de transition* à partir de l'élément chromotrope jeune, issu d'une plaquette vitelline, jusqu'au grain le plus évolué situé dans l'aster.

Il faut d'ailleurs faire observer que d'importantes variantes spécifiques ont été relevées quant au comportement des éléments métachromatiques. Une distinction radicale entre granules α et β a été trouvée par Pasteels (1955) et par Pasteels & Mulnard (1957). Mais chez *Chaetopterus*, Mulnard (1959) décrit une troisième structure, qui pourrait n'être que le matériel chromotrope passant des granules α aux granules β .

Chez les mammifères comme chez les Ascidiés, Dalcq (1952, 1957) n'est pas parvenu à retrouver deux groupes nettement distincts de granules métachromatiques. Chez *Asciidiella aspersa*, cet auteur décrit, à l'approche de la gastrulation, des corpuscules qui résultent de la rupture des plaquettes vitellines et deviennent métachromatiques. Cette observation se rapproche des données que nous avons recueillies chez *Artemia*, où cependant tout le matériel métachromatique trouve son origine dans le vitellus, selon le processus que nous venons de décrire.

RÉSUMÉ

La coloration au bleu de toluidine sur matériel fixé permet de montrer chez *Artemia salina* la présence de granules chromotropes dans l'œuf en vitellogénèse, en maturation et en segmentation. Ces granules trouvent leur origine dans

certaines plaquettes vitellines. Jeunes, ils se trouvent entre le vitellus, mais tout en 'mûrissant' ils vont s'accumuler, à partir du moment de la copulation des pronucléi, dans le plasme périnucléaire. Pendant les mitoses, ils sont essentiellement localisés à la périphérie des asters. Leur nombre diminue vers la fin de la segmentation. Alors qu'ils semblent jouer un rôle dans les mitoses, leur formation progresse cependant de manière indépendante chez les femelles vierges où les œufs restent bloqués à la métaphase de la première division de maturation.

SUMMARY

Toluidine blue staining of fixed eggs of *Artemia salina* reveals during vitellogenesis, maturation, and segmentation the presence of metachromatic granules. These granules originate in certain yolk platelets. Scattered throughout the yolk, they show a series of progressive transformations while migrating into the perinuclear plasm, which they reach at the time of copulation of the pronuclei. During the cleavage divisions they are principally located around the asters. New elements continue to be formed within the yolk until the end of cleavage, when metachromatic elements disappear from the egg. Though they have obviously something to do with the rapid succession of mitoses during cleavage, their formation continues nevertheless in virgin females whose eggs are blocked in metaphase of the first maturation division.

TRAVAUX CITÉS

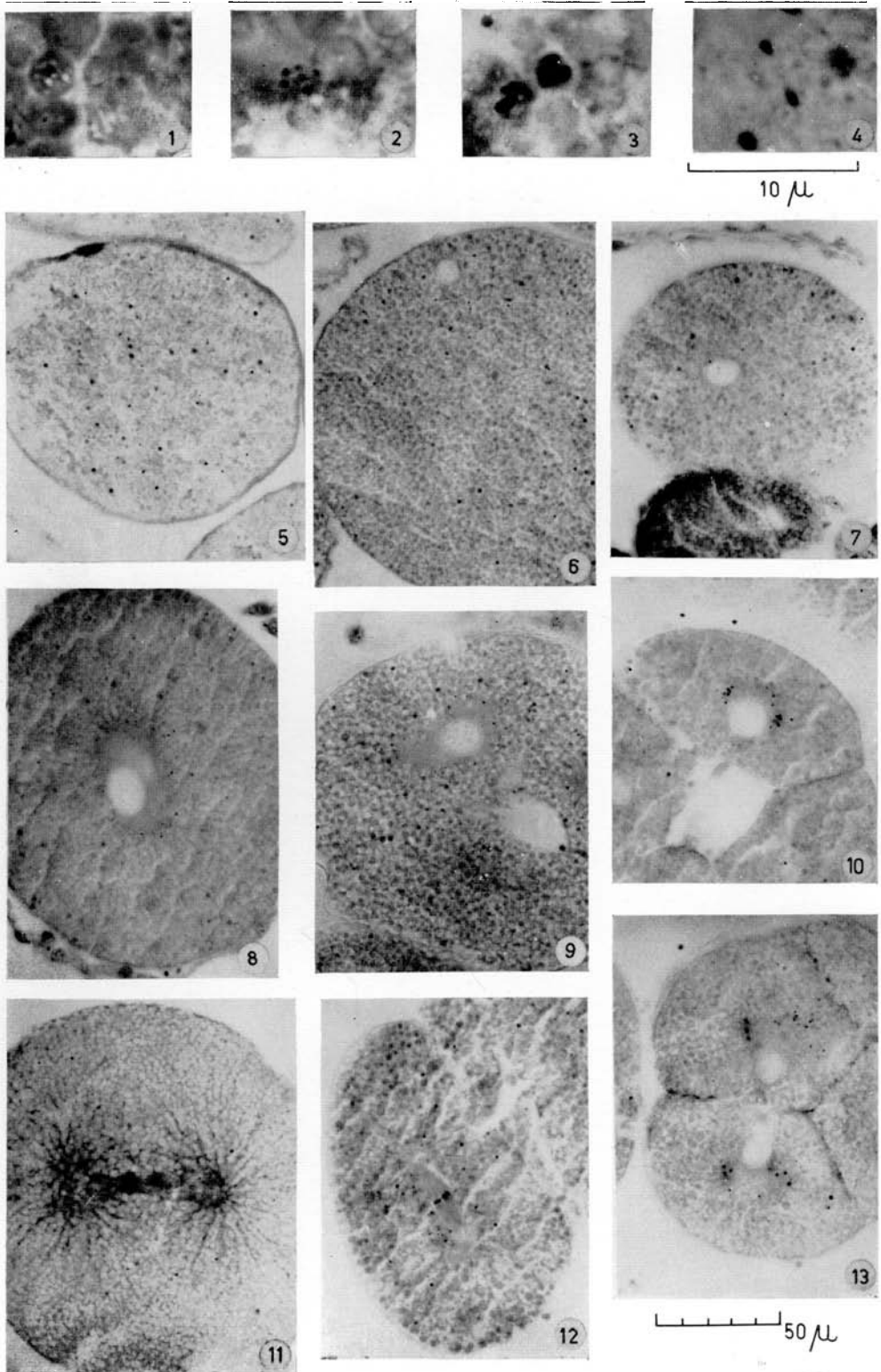
- DALCQ, A. (1952). La coloration vitale au bleu de toluidine et sa manifestation métachromatique. *C.R. Soc. biol. Paris*, **146**, 1408-11.
- (1957). La métachromasie *in vivo* au bleu de toluidine dans l'œuf et l'embryon d'ascidie. *Bull. Soc. zool. Fr.* **82**, 296-316.
- (1960). Dans *Fundamental Aspects of Normal and Malignant Growth*, éd. W. W. Nowinski. Amsterdam, London, New York: Elsevier.
- FAUTREZ, J., & FAUTREZ-FIRLEFYN, N. (1959). Les polysaccharides au cours des mitoses pendant la maturation et la segmentation de l'œuf d'*Artemia salina*. *Arch. Biol. Liège et Paris*, **70**, 133-52.
- FAUTREZ-FIRLEFYN, N. (1960). Les mouvements des mitochondries au cours des divisions de segmentation de l'œuf d'*Artemia salina*. *C.R. Soc. Roy. Zool. Belg.* (sous presse).
- MICHAELIS, L. (1947). The nature of the interaction of nucleic acids and nuclei with basic dyestuffs. *Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **12**, 132-42.
- MULNARD, J. (1959). La métachromasie *in vivo* et son analyse cytochimique dans l'œuf de l'Annelide *Chaetopterus pergamentaceus*. *Arch. Biol. Liège et Paris*, **69**, 645-85.
- PASTEELS, J. (1955). Évolution de la métachromasie au bleu de toluidine suivie sur le vivant, au cours des premières phases du développement de l'oursin et de la pholade. *Bull. Acad. Roy. Belg., Cl. Sci.* **61**, 761-8.
- & MULNARD, J. (1957). La métachromasie *in vivo* au bleu de toluidine et son analyse cytochimique dans les œufs de *Barnea candida* et *Gryphea angulata* (Lamellibranches) et de *Psammechinus miliaris*. *Arch. Biol. Liège et Paris*, **68**, 115-63.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fragments d'œuf d'*Artemia salina* fixés à l'AFA et colorés au bleu de toluidine. Par l'usage d'un filtre vert les grains rouges (métachromasie γ) apparaissent en noir. A noter que la fixation à l'AFA est peu favorable pour la mise en évidence des asters, qui se soupçonnent par leurs irradiations entre les grains de vitellus. La mise au point fut essentiellement faite sur les granules M.

FIGS. 1-4. Formation des granules M à partir du vitellus (à fort grossissement).

FIG. 1. Micro-vacuoles refringentes et 'vides' au sein de granules de vitellus.



- FIG. 2. Les micro-vacuoles se remplissent de substance chromotrope.
- FIG. 3. Les micro-vacuoles confluent au sein du grain de vitellus qui se rétracte.
- FIG. 4. Grains M mûrs à la périphérie du plasme périnucléaire. Substance à métachromasie γ en noir; les granules bleuâtres, qui y sont accolés, apparaissent moins foncés.
- FIG. 5-7. Stades de maturation et de fécondation, pendant lesquels les granules M 'jeunes' restent irrégulièrement distribués dans la masse vitelline.
- FIG. 5. Métaphase de la 1^e division de maturation (image mitotique vers le haut de l'œuf).
- FIG. 6. Le pronucléus se gonfle encore près de la surface ovulaire.
- FIG. 7. Le pronucléus suivi d'un petit aster spermatique (vers le haut) s'enfonce dans l'œuf.
- FIG. 8. Accolement des pronucléi au sein d'un large plasme périnucléaire à la périphérie duquel des grains M mûrs viennent s'accumuler.
- FIG. 9. Stade IV, intercinèse. Granules M jeunes distribués entre le vitellus et granules M mûrs (plus petits) situés à la périphérie du plasme périnucléaire.
- FIGS. 10-13. Situation des grains M au cours de la mitose.
- FIG. 10. Stade VIII, début de la prophase. Les granules M se concentrent vers les 2 pôles.
- FIG. 11. Stade V, anaphase. Les granules M se situent surtout dans les deux asters.
- FIG. 12. Stade II, métaphase. Les granules M se trouvent également au niveau des deux asters (œuf cultivé *in vitro*).
- FIG. 13. Stade VIII. Fin de la télophase. Les grains M semblent quitter la région périphérique des asters pour aller entourer les noyaux reformés.

(Manuscript received 13 : vii : 60)