



Fascicule 67

H. DAMAS - La coloration des tissus chargés de vitellus.  
Arch. Biol. LVI 395-404 1945

Fascicule 68

M. LEJEUNE-CARPENTIER - L'étude microscopique des Silex.  
Une Hystrichosphaeridée à classer parmi les Péridi-  
niens.  
Ann.Soc.Géol.Belg. LXVII B 22-28 1944

\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*  
\*

## La Coloration des tissus chargés de vitellus

PAR

H. DAMAS

(Institut Ed. van Beneden, Liège)

---

(1 figure dans le texte)

---

On sait les difficultés rencontrées dans la coloration des tissus chargés de vitellus. En général, les plaquettes deutoplasmiques fixent les colorants avec une intensité extrême. Elles deviennent les éléments les plus apparents des préparations, et, pour peu qu'elles soient un peu nombreuses, arrivent à masquer complètement toutes les autres structures. Certains tissus, comme ceux des embryons de *Lamproie*, sont littéralement bourrés de plaquettes circulaires ou ovalaires qui prennent souvent la même teinte que les noyaux cellulaires. Comme on choisit d'habitude une teinte sombre comme colorant nucléaire, les préparations deviennent absolument illisibles.

Certes, il n'est pas difficile d'obtenir une opposition entre la teinte prise par les plaquettes vitellines et celle des autres structures. Il suffit, pour cela, de fixer au préalable les tissus à l'aide de liquides à base de sublimé, le Zenker ou le Helly, par exemple. Mais, ces fixateurs, à médiocre pouvoir pénétrant, n'assurent pas une conservation convenable des tissus embryonnaires et ne peuvent guère être employés pour des recherches morphologiques.

Les nombreux échecs rencontrés dans l'étude d'un matériel embryologique très vitellin — il s'agissait, en l'occurrence de *Lampetra fluviatilis* — nous ont amené à chercher à

mettre au point une méthode de coloration adéquate, applicable à ces tissus après fixation par un liquide ordinaire, mais de bonne qualité, tel que le Bouin ou ses variantes.

Le hasard nous mit sur la voie. Des préparations parfaites furent réussies, un jour, à l'aide d'une solution de Biondi dont la liqueur mère était, accidentellement, demeurée plusieurs mois à l'étuve à 35°. Ce liquide, utilisé suivant la technique indiquée dans ROMEIS, teignait les noyaux et les limites cellulaires en bleu violacé, le protoplasme et les nucléoles en rose, les plaquettes vitellines en jaune orangé. L'étonnant fut que cette coloration ne réussit pas régulièrement avec des liquides préparés de la même façon. Il était donc évident que, dans la solution favorable, il s'était produit une modification des constituants du Biondi. Par conséquent, pour arriver à colorer à coup sûr les tissus vitellins, il devenait nécessaire d'étudier, de façon approfondie, les réactifs utilisés ainsi que les causes d'échec.

#### COMPOSITION DU LIQUIDE DE BIONDI

C'est une solution légèrement acidulée de vert de méthyle, d'orange G et de fuschine acide. Depuis KRAUSE (voir ROMEIS), on la prépare de la façon suivante : une solution très concentrée est dissoute à l'étuve à 35° ; ensuite cette solution est diluée au 1/20 dans un flacon qui a contenu de l'eau acétifiée à 1 % — les gouttes d'eau acidulée demeurant sur la paroi du flacon servent à donner au colorant l'acidité nécessaire.

*Vert de méthyle.* — Colorant basique, dérivé du triphénylméthane. C'est en fait du cristal-violet, ou hexaméthylpararosaniline, auquel est ajouté un groupe chlorure de méthyle. Ce groupe se fixe sur un atome d'azote qui, de tri- devient pentavalent. Cette liaison est très lâche, de sorte que le vert de méthyle est fréquemment souillé de violet. D'habitude, on l'en débarrasse par agitation avec le chloroforme. Mais, dans les mélanges contenant des colorants acides, il s'en reforme spontanément, sans cesse. C'est le cas

du li  
respo  
et le

Le  
De ve  
au bl  
pâle  
Ces v  
immé  
24 he  
son e  
qu'en

Vic  
de m  
Mais  
les vi  
le no  
tétra-  
crista  
légère  
les pl  
le vic  
donné  
vue,  
spécia

Ce  
de tei  
bleu v  
rose l  
partir  
en m

Tou  
phtal  
leur

(1) C  
à 1°/oo

du liquide de Biondi et le cristal violet est évidemment responsable de la teinte bleue violacée prise par les noyaux et les limites cellulaires dans nos préparations.

Le vert de méthyle change de teinte en fonction du pH. De vert jaune clair au pH 1, il passe au vert franc au pH 2, au bleu vert aux pH 3, 4, 5, 6, pâlit au pH 7, devient violet pâle aux pH 8 et 9 et se décolore à partir du pH 10 <sup>(1)</sup>. Ces variations de teinte ou d'intensité ne sont pas toujours immédiates, mais ne se manifestent parfois qu'après 24 heures. De cette liste, on peut conclure que, pour donner son effet caractéristique, ce colorant ne peut s'employer qu'entre les pH 3 et 6.

*Violet de Méthyle.* — La perte d'un groupement chlorure de méthyle transforme le vert de méthyle en cristal violet. Mais il existe un groupe de substances colorantes voisines, les violets de méthyle, qui ne diffèrent entre elles que par le nombre de groupes méthyle qu'elles contiennent : les tétra-, penta- et hexa-pararosanine, cette dernière étant le cristal violet. Les divers termes de cette série diffèrent légèrement de teinte, les moins méthylés étant plus rouges, les plus méthylés plus bleus. Au point de vue tinctorial, le violet B, un mélange fortement méthylé, nous a paru donner les effets les plus agréables à l'œil, être, à ce point de vue, préférable au cristal violet, et nous l'avons examiné spécialement.

Ce colorant basique, nucléaire, change également de de teinte en fonction du pH. Bleu aux pH 1 et 2, il devient bleu violet au pH 3, mauve au pH 4, violet rouge au pH 5, rose légèrement bleuté au pH 6, et enfin redevient violet à partir du pH 7. C'est donc également un colorant à utiliser en milieu franchement acide, au plus au pH 5.

Tous ces violets sont précipités de leurs solutions par les phthalates. Par conséquent, lorsqu'il est désirable d'éviter leur présence dans des solutions de vert de méthyle, il

---

<sup>(1)</sup> Ces observations ont été faites en versant 1 cm<sup>3</sup> de solution à 1‰ dans 20 cm<sup>3</sup> de solution-tampon.

suffit d'utiliser ce dernier colorant dans un mélange tampon de Clarks et Lubbs.

Chose curieuse, le violet de méthyle ne teint les structures microscopiques d'une façon appréciable qu'en présence de vert de méthyle. L'intensité de la teinte violette obtenue par l'emploi d'une solution de teneur déterminée en violet est à peu près proportionnelle à la quantité de vert présente.

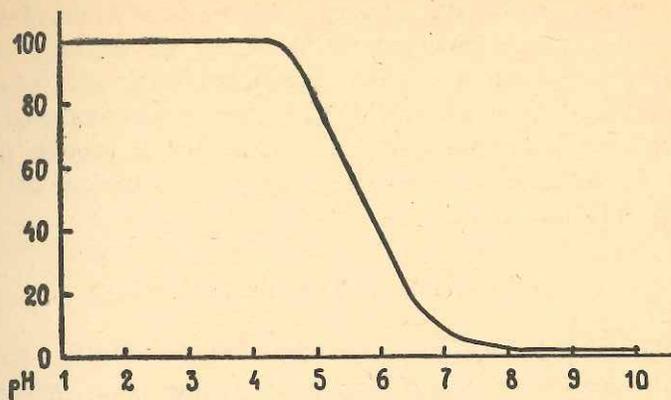
Les violets de méthyle sont excessivement solubles dans l'alcool. En déshydratant les préparations microscopiques, on court par conséquent le risque d'extraire entièrement la couleur violette. Il est facile d'éviter cet accident : un passage bref de la préparation colorée dans une solution à 2% d'acide phosphotungstique insolubilise le violet.

*Orange G.* — Colorant azoïque fortement acide (sel sodique d'acide di-sulfonique de benzène azo-naphtol). Sa teinte ne varie absolument pas en fonction du pH, tout au moins dans l'échelle 2-10 qui, seule, a paru intéressante pour ces essais.

*Fuschine acide.* — Ce colorant est un dérivé sulfoné de la fuschine basique. Il existe théoriquement plusieurs dérivés possibles. On admet que le produit commercial est en général un sel di- ou tri-sodique de l'acide rosaniline-trisulphonique.

Ce corps, de teinte rouge sang en solution acide, pâlit très fortement dans les milieux basiques. Cela nous a amené à établir une courbe d'intensité en fonction du pH. Nous avons utilisé pour cela un colorimètre de Duboscq et pris comme étalon une solution tampon au pH 5 contenant, dans 20 cm<sup>3</sup>, 1 cm<sup>3</sup> de colorant à 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub>. Voici la courbe. Elle montre que la teinte d'une solution de fuschine acide diminue très rapidement à partir du pH 4,3. Elle est pratiquement décolorée au pH 8. De nouveau, cet atténuation de la couleur n'est pas instantané. Il faut environ 6 heures pour qu'il se manifeste de façon complète.

*Produits de réactions entre les colorants.* — Le mélange de solutions à 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub> d'orange G ou de fuschine acide avec des solutions également à 1<sup>o</sup>/<sub>100</sub> de vert ou de violet de méthyle provoque la formation d'un abondant précipité. Ce précipité



Variations de la teinte d'une solution de fuschine acide en fonction du pH.

recueilli après lavage, est très soluble dans l'alcool méthylique, mais très faiblement dans l'eau. Cependant, le produit de l'union du violet ou du vert avec la fuschine est notablement plus soluble que celui de l'union semblable avec l'orange. Mis en solution dans des liquides tamponnés, ces produits possèdent des teintes assez semblables à celles du colorant basique utilisé, mais plus rouges ou plus jaunes.

Les mêmes transformations se passent évidemment dans le liquide de Biondi. De fait, il est possible de diminuer le pouvoir tinctorial rouge d'une solution de teneur déterminée en fuschine acide de deux façons : soit en diminuant son acidité — ce qui diminue l'agressivité de la fuschine ; soit en augmentant sa teneur en colorants basiques — ce qui ne peut s'expliquer que par un blocage de la fuschine par ces couleurs basiques.

Il est peu probable que les produits de l'union des deux types de colorants restent inactifs dans les manipulations histologiques. Au contraire, nous savons que dans les mélanges genre Giemsa et May-Grünwald, le produit actif est le résultat d'une combinaison entre colorant basique et colorant acide, azur ou bleu de méthylène d'une part, éosine d'autre part, combinaison qui se dissocierait au contact des tissus et teindrait différemment les diverses

parties des cellules (voir LANGERON). Il se passe certainement des phénomènes analogues dans le cas du mélange de Biondi. C'est pourquoi il nous paraît impossible d'éliminer du colorant cherché la fuschine acide, malgré sa tendance à surcolorer toutes les structures, parce que le produit de l'union fuschine-violet est beaucoup plus soluble que celui de l'union orange-violet.

#### COMPOSITION DU LIQUIDE PROPOSÉ

Sur ces prémisses, nous avons cherché à établir une formule de colorant qui fût adaptée au cas des tissus chargés de vitellus, même s'ils étaient fixés à l'aide de liquides picriqués. Certaines données sont maintenant évidentes. Il faut incorporer à la formule le violet de méthyle puisque celui-ci est, en fait, le colorant nucléaire actif. Le vert de méthyle n'est maintenu que comme adjuvant de la réaction et il se révèle que la proportion la plus favorable consiste à employer des quantités égales des deux colorants basiques. L'orange G sera le colorant protoplasmique utilisé principalement car il ne présente pas de tendance à surcolorer toutes les structures et parce que la teinte qu'il donne aux plaquettes vitellines est plus reposante à l'œil que la couleur rouge sang donnée par la fuschine. Mais la fuschine ne sera pas négligée, car elle seule fournit par union avec le vert ou le violet, un colorant neutre soluble dans l'eau. Pour éviter qu'elle ne couvre les autres teintes, il suffit de régler l'acidité du milieu. Le mélange sera donc employé à un pH supérieur à 4,5 — car c'est à partir de ce point que l'agressivité de la fuschine diminue brusquement. Le pH sera cependant inférieur à 5 car, au delà, le violet de méthyle, à son tour, pâlit très fort, en changeant d'ailleurs de teinte.

Enfin, il est nécessaire d'utiliser une solution tamponnée, pour éviter toute variation de l'acidité du milieu.

Le problème étant ainsi délimité, nous avons effectué un bon nombre d'essais de mélanges colorants, en employant comme solution tampon le mélange acide acétique-acétate

de soude. Plus de 50 liquides variés ont été ainsi essayés et voici la formule proposée.:

Vert de méthyle.....	0,1 gr.
Violet de méthyle .....	0,1 gr. <sup>(1)</sup>
Orange G .....	0,1 gr.
Fuschine acide .....	0,06 gr.
HAc N/5 .....	50 cm <sup>3</sup>
NaOH N/5 .....	20 cm <sup>3</sup>
H <sup>2</sup> O q.s. pour 100 cm <sup>3</sup> .	

Les poudres colorantes sont mélangées au mortier puis dissoutes dans le liquide tampon. Eventuellement, la solution sera chauffée modérément pour faciliter la dissolution. Ensuite, elle doit reposer environ 24 heures avant d'être prête à l'emploi car ses constituants ne s'adaptent pas immédiatement à la réaction du milieu. Le mélange ainsi composé possède un pH de 4,65. Il est stable : certains échantillons fabriqués il y a plusieurs mois continuent à nous donner entière satisfaction.

*Mode d'emploi.* — Les coupes amenées à l'eau distillée, sont plongées immédiatement dans le colorant. Il est néfaste de les rincer abondamment pour faire disparaître l'acide picrique, car ce lavage prolongé extrait une grande partie des substances nucléaires et ne laisse de colorable par le violet de méthyle que le pourtour des noyaux.

Les coupes séjournent 10 minutes dans le colorant. Ce temps ne doit pas être dépassé. En effet, le violet et l'orange teignent à peu près instantanément tandis que l'action de la fuschine est progressive et s'additionne sans arrêt. Par conséquent, plus longue sera la durée du séjour des coupes dans le mélange colorant, plus rouge sera la teinte des

---

(1) Tous les violets de méthyle peuvent convenir. Il semblerait logique d'utiliser le cristal-violet puisque c'est celui dont la formule se rapproche le plus de celle du vert de méthyle et que c'est lui qui se trouve normalement, comme impureté inévitable, dans les solutions de vert. En fait, nous avons constaté que le violet de méthyle B fournit des teintes plus agréables à l'œil.

préparations. Rapidement, les plaquettes, puis les limites cellulaires deviendront rouge-sang et les préparations seront très peu lisibles. A cause de la brièveté du séjour des préparations dans le colorant, il est préférable de ne traiter que peu de porte-objets à la fois. Sinon, le passage des lames de verre dans les batteries de Borrel amène inévitablement des différences entre le temps de coloration des premiers et des derniers termes de la série et cela se traduit par des inégalités de coloration. Aussi, nous avons pris l'habitude de ne colorer que deux porte-objets à la fois.

Après coloration, les coupes sont rincées rapidement à l'eau distillée puis la couleur en est fixée par un séjour bref ( $\frac{1}{2}$  à 1 minute) dans une solution d'acide phosphotungstique à 2%. La durée de ce passage est à peu près indifférente. Tout au moins des préparations ayant séjourné  $\frac{1}{2}$  minute dans l'acide ne se distinguent pas de celles qui y ont séjourné 10 minutes.

Après un second rinçage à l'eau distillée, les coupes sont déshydratées rapidement à l'alcool à 95°, à l'alcool absolu, passées au xylol et montées au baume.

La coloration obtenue est stable. Des préparations faites en 1941 sont actuellement aussi belles que le premier jour.

#### RÉSULTATS

Les colorations ainsi réalisées répondent parfaitement aux desiderata exposés au début de cette note. Leur teinte générale est orangée, car les plaquettes vitellines ont pris l'orange G. Sur ce fond, tranche fortement la couleur violette des noyaux et des limites cellulaires. A l'intérieur du noyau, le nucléole est rouge orangé. Le protoplasme enfin prend des teintes variées, de rouge à mauve.

Le mélange a été essayé avec des résultats parfaits sur des embryons de Lamproie, de Grenouille rousse, d'Axolotl, fixés au Bouin alcoolique ou au Bouin ordinaire. Il a même été employé sur des coupes de jeunes Salamandres (5 cm.

9 C  
de long  
dernier  
qui son  
Cepen  
en gén  
Biondi.

Il pe  
des tein  
soit tro  
très jeu  
ne cont  
les sta  
celui de  
chez qu  
entre le  
proposé  
de la f  
des lim  
force s  
diminu  
quantit  
tion co  
On obt  
avec pl  
solution

La c  
rempla  
une lac  
chargés  
une mé  
topogra  
facilite

Une  
l'influe

de longueur environ) fixées au Bouin-Hollande, et, dans ce dernier cas, il a fourni des résultats assez analogues à ceux qui sont décrits dans ROMEIS pour le mélange de Biondi. Cependant, les structures protoplasmiques se trouvaient en général plus jaunes qu'il ne l'est indiqué à propos du Biondi.

Il peut arriver que l'on ne soit pas entièrement satisfait des teintes prises par les tissus, qu'on les trouve soit trop, soit trop peu rouges. Le premier cas est celui d'embryons très jeunes, dont les tissus ne sont pas encore spécialisés, ne contiennent en pratique que des plaquettes vitellines, les stades de segmentation par exemple. Le second est celui de larves âgées dont le protoplasme est déjà évolué et chez qui on désire faire apparaître des différences de teintes entre les structures. Il est très aisé d'adapter la formule proposée à ces besoins particuliers. Pour diminuer l'action de la fuschine et obtenir des préparations dans lesquelles des limites cellulaires et des noyaux violets tranchent avec force sur une masse de plaquettes orangées, il suffit de diminuer l'acidité du liquide et pour cela augmenter la quantité de soude. Nous employons dans ce but une solution contenant — au lieu de 20 — 30 cm<sup>3</sup> de soude N/5. On obtient d'autre part, un liquide où la fuschine agit avec plus d'intensité en diminuant à 15 cm<sup>3</sup> la quantité de solution de soude.

La coloration que nous proposons n'a pas l'ambition de remplacer les anciennes méthodes, mais plutôt de combler une lacune en permettant l'étude aisée de tissus fortement chargés de vitellus. D'autre part, elle ne prétend pas être une méthode cytologique, mais simplement une coloration topographique. Comme telle, nous la croyons capable de faciliter beaucoup certaines recherches embryologiques.

\* \* \*

Une mise au point de ce genre, qui a nécessité l'étude de l'influence du pH sur les colorants, n'aurait pu se faire

exclusivement dans un laboratoire de zoologie. Nous avons dû avoir recours aux bons services de MM. les professeurs DESREUX, FLORKIN et LECLERCQ qui ont bien voulu mettre à notre disposition les appareils de mesure nécessaires. Nous sommes heureux de pouvoir leur exprimer ici notre gratitude.

#### BIBLIOGRAPHIE

- CONN, J., 1929. — Biological Stains, Geneva N. Y., U. S. A., 2<sup>e</sup> édit.  
LANGERON, M., 1921. — Précis de microscopie, 3<sup>e</sup> édit., Paris.  
ROMEIS, B., 1932. — Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 13<sup>e</sup> édit., München und Berlin.
-