

## Les genitalia chez les papillons

Ce texte est une adaptation personnelle d'un article publié sur un site appelé « l'entomologie ludique et interactive », complétée par diverses techniques de coloration.

Depuis le début du 20ème siècle, les entomologistes ont à leur disposition des moyens remarquables de détermination macroscopique des insectes. Parmi la multitude d'atlas magnifiquement illustrés mis à notre disposition, citons ce qui, malgré son âge séculaire, reste une bible : « *Gross-Schmetterlinge der Erde – Les Macrolépidoptères du Monde* », de Adalbert Seitz, un entomologiste allemand. Cet ouvrage compte 16 volumes et 4 suppléments, dont le début de publication commença en 1907.

Mais parfois, il faut faire appel à la microscopie pour des déterminations précises ; et pour cela, il faut s'intéresser plus particulièrement à l'étude des armatures génitales sclérifiées, des mâles et des femelles.

Il faut tenir comme une certitude que tous les individus d'une même espèce, présentent des structures génitales (appelées genitalia), identiques pour chacun des sexes. Ces structures sont typiques, et différentes pour chaque espèce ; elles sont assez semblables au sein d'un même genre, mais nettement différentes pour des espèces appartenant à d'autres genres ou familles.

L'observation de ces structures est surtout pratiquée chez les Lépidoptères, (Rhopalocères ou Hétérocères), les Coléoptères, Les Orthoptères (sauterelles) et les Diptères (moustiques).

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux genitalia des papillons.

### L'armature génitale d'un mâle de Lépidoptère.

Elle est située à l'extrémité de l'abdomen, sur les derniers segments. Généralement, une paire de formations symétriques émerge : ce sont les valves. Lors de l'accouplement, la femelle est fermement maintenue en place par trois appendices externes du mâle : un crochet dorsal, l'uncus, et deux plaques latérales, les valves. Ces valves maintiennent latéralement l'extrémité de l'abdomen de la femelle, tandis que l'uncus s'insère dorsalement dans la membrane intersegmentaire du dernier anneau de la femelle.

Sur ces structures sont insérés des muscles qui servent à l'accouplement. Le mâle, alors, introduit son pénis (édéage), dans l'orifice de copulation de la femelle (ostium bursae), et injecte ses spermatozoïdes par le truchement d'un spermatophore. Ce dernier, qui abrite les spermatozoïdes, est un conduit creux et gélatineux. Il glisse le long d'un canal appelé le ductus bursae, jusqu'à une sorte de sac appelé bourse copulatrice. De cette bourse, un très fin canal, nommé ductus seminalis, amène la semence jusqu'aux ovaires. L'accouplement est long et peut durer plusieurs heures.

### Les genitalia d'une femelle de Lépidoptère

La structure génitale de la femelle comprend des pièces externes plus ou moins sclérifiées que l'on appelle les plaques anté- et postvaginales. Elles entourent l'orifice de copulation. De cet orifice génital, part un conduit interne plus ou moins long et plus ou moins complexe, le ductus bursae, qui aboutit à une sorte de grand sac appelé bourse copulatrice. Sa forme est généralement oblongue, mais elle peut prendre des formes multiples, avec des diverticules plus ou moins longs et plus ou moins sclérifiés. Les parois de la bourse peuvent être minces ou épaisses, plissées ou lisses. Elles portent parfois des épines (signum) ou des zones sclérifiées garnies de nombreuses petites épines, plus ou moins fortes, appelées laminae dentatae.

De la bourse copulatrice (ou du ductus bursae) est issu un très fin conduit, le ductus seminalis, qui aboutit aux ovaires. Il permet aux spermatozoïdes de migrer pour féconder les ovules, à la demande de la femelle. Lors de l'étude des genitalia de la femelle, on observe souvent des vestiges de plusieurs spermatophores. C'est le résultat de plusieurs accouplements de la femelle durant sa vie éphémère qui dure environ 3 semaines.

La ponte se fait par l'orifice de ponte qui est encadré par deux processus appelés lobes de l'oviporus. Ces lobes membraneux sont couverts de poils sensitifs très nombreux qui aident la femelle à positionner ses oeufs sur la feuille de la plante hôte.

### PRÉALABLE

++ Il est nécessaire de disposer d'une loupe binoculaire et d'une plaque chauffante.

++ Un colorant spécifique : le noir chlorazol (à conserver en flacon brun, car il ne supporte pas la lumière). Il peut être remplacé par du vrai mercurochrome (pas de l'éosine), de l'orange G, de la safranine, voire de la teinture d'iode.

### MODE OPÉRATOIRE

#### Phase 01

++ Placer l'abdomen, détaché du corps du papillon, dans un bain de potasse ou de soude caustique saturée, colorée avec du mercurochrome. Cette première coloration aidera à repérer les différentes pièces des armures génitales, parfois difficiles à distinguer des amas graisseux résiduels.

++ A froid, cela prendra de 3 à 7 jours, selon le volume de l'abdomen.

++ A chaud (60 à 70° maximum – surtout, ne pas laisser bouillir), 4 à 6 heures suffiront.

**Phase 02** : c'est la plus délicate

++ A l'aide d'un outil adéquat, éliminer les poils et les écailles qui recouvrent l'abdomen..

++ Ensuite, repérer la membrane latérale qui réunit tergites et sternites.

++ Déchirer cette membrane avec une fine pince, afin d'étaler la cuticule de l'abdomen et d'avoir accès aux pièces génitales. Cette opération est indispensable pour dégager les armatures génitales de la femelle. Celles du mâle peuvent être dégagées en saisissant l'uncus et en le tirant vers l'extérieur. Les valves sont alors complètement dégagées.

++ Enlever les graisses restantes, ainsi que les restes des divers organes de la digestion. La pré-coloration des genitalia permet de bien séparer les pièces génitales et d'éviter de les sectionner par inadvertance. Cette opération se fait sous la loupe binoculaire, dans une petite BP en verre avec quelques gouttes d'eau.

**Phase 03** : 2 possibilités

**Coloration au mercurochrome**

++ Laver plusieurs fois les organes génitaux et la cuticule abdominale.

++ Colorer au mercurochrome, pendant 24 heures (solution aqueuse 50/50).

++ En cas de surcoloration, pratiquer une coloration régressive avec quelques gouttes d'eau de Javel.

++ Rincer rapidement 2 ou 3 fois à l'eau bidistillée.

++ Monter dans l'Aquatex, sur une LPO avec calages.

**Coloration au noir de chlorazol**

++ Laver plusieurs fois les organes génitaux et la cuticule abdominale.

++ Placer une minute dans un bain de méthanol (ou d'éthanol) à 70°.

++ Répéter l'opération dans de l'alcool à 90°.

++ placer durant 1 à 3 minutes dans du noir de chlorazol alcoolique (en cas de surcoloration, il s'avère difficile de régresser : plonger durant plusieurs heures dans de l'alcool à 90°, et surveiller la régression).

++ Laver dans une solution d'alcool à 70°.

++ Rincer rapidement 2 ou 3 fois à l'eau bidistillée.

++ Monter dans Aquatex, sur une LPO avec calages.

OU

..... comme précédent

++ Laver dans une solution d'alcool à 70°.

++ Placer les genitalia et la peau de l'abdomen dans de l'alcool à 95° durant 30 secondes.

++ les plonger ensuite dans du toluène phéniqué (de 30 secondes à 5 minutes, selon le volume des pièces) pour déshydratation totale.

++ Sur une LPO bien dégraissée, munie de calages, poser une goutte de BC mélangée à une goutte de toluène phéniqué.

++ Disposer les armatures génitales et la cuticule abdominale dans le mélange. Le BC ramollit les pièces génitales et facilite leur disposition.

Sous la loupe, à l'aide de minuties, ouvrir les valves (si cela est possible), et disposer l'édéage sous l'armature génitale après l'avoir extrait de sa loge. C'est assez délicat. Si possible, étaler la vésica pour en montrer les spicules et les épines.

Pour les genitalia de la femelle, on veillera à extraire de la bourse copulatrice les spermatophores, en l'incisant légèrement avec les pincettes.

La présence éventuelle de bulles indique un manque de déshydratation → ajouter une goutte de toluène phéniqué.

Poser une goutte de BC au centre de la LCO ; la retourner vivement et poser sur la préparation.

Le séchage peut prendre plusieurs semaines. Le forçage à l'étuve nous paraît inutile et risqué : patience est mère de réussite.

## Technique préconisée par Claude Tautel<sup>1</sup>, spécialiste en la matière

L'utilisation du noir de chlorazol permet de distinguer les différents types de tissus, alors que la fuchsine colore l'ensemble de la pièce sans aucun relief.

**++** Découper doucement l'abdomen de l'exemplaire (ciseaux fins ou pinces si l'exemplaire est sec).

**++** Plonger l'abdomen dans une solution de potasse (grains de potasse mélangés à l'eau).

2 possibilités :

➤ à froid : laisser tremper une nuit entière.

➤ à chaud : prendre un récipient de type porcelaine (car le verre fait des projections) et faire bouillir (bec bunsen ou simplement lampe à alcool à brûler).

On voit alors l'abdomen devenir "transparent" au bout de 5 à 10 mn. Attention toutefois de ne pas trop laisser dans la potasse bouillante sinon on risque des déformations fort trompeuses (j'utilise personnellement cette dernière solution).

**++** Laver l'abdomen à l'eau.

**++** Le poser sur une plaque de verre pour opération sous loupe binoculaire avec un bon éclairage (lampe à led ou quartz ou mieux éclairage à lumière froide).

**++** Ouvrir l'abdomen (avec un petit scalpel, ou des ciseaux de chirurgie, ou de simples épingles ou des pinces) pour en extraire l'extrémité : ce sont les pièces génitales qui sont chitinisées.

**++** Les pièces génitales sont soigneusement mis à part, voire également le 8ème sternite des mâles pour certains groupes.

**++** Prendre un peu de noir de chlorazol dilué à l'eau bidistillée : faire tomber le mélange sur les pièces génitales jusqu'à ce que la coloration "révèle" les différents tissus.

**++** Nettoyer les pièces génitales dans une coupelle d'alcool le plus pur possible.

**++** Faire tomber sur une autre lame propre 3 gouttes d'Euparal (on a longtemps employé l'Eukitt mais c'est un produit dangereux et trop toxique, soluble au benzène). Les Anciens utilisaient le baume du Canada, mais il a le désavantage de jaunir à la longue.

**++** Installer la pièce génitale dans la goutte d'Euparal et l'étaler sous la bino.

**++** Une fois tout bien étalé et disposé (pour les mâles, valves et édéage), positionner doucement la LCO, ronde de préférence (20 mm de Ø).

C'est terminé : laisser à horizontale pour une nuit de séchage. Poser une étiquette provisoire pour éviter toute erreur.

**++** Installer l'étiquette définitive : carré de papier collé avec de la colle à papier traditionnel sur le côté gauche de la lame en indiquant la provenance, la date de capture de l'exemplaire, le nom du collecteur et le numéro de la préparation.

**++** Créer une étiquette portant le numéro de la préparation à piquer avec l'aiguille entomologique du papillon.

**++** Tenir un cahier des préparations avec tous les renseignements nécessaires : numéro de la préparation, nom de la collection, provenance précise du papillon, date de capture, sexe de l'individu, détermination, nom du détermineur et année de la détermination, ou de la préparation.

**++** Ranger verticalement la préparation dans une boîte prévue à cet effet.

### REMARQUES

= Les genitalia femelles doivent être préparés dans leur entier : attention aux parties supérieures, les papilles notamment.

= Idem pour les mâles : étaler les valves à plat et surtout l'édéage dont certains préparateurs font sortir l'intérieur (édéage évaginé) pour mieux observer les cornuti (petites pièces chitinisées).

= Bien souvent, il peut être utile de préserver l'abdomen dans son entier. Lorsqu'on travaille avec une institution, ceci est désormais obligatoire. L'abdomen sera alors fendu dans sa longueur (ciseaux fins ou pinces), pour être étalé comme si on ouvrait un livre. Pour obtenir un bon résultat, il faut bien débarrasser l'abdomen des écailles restantes et des restes des viscères, en plusieurs allers et retours dans l'eau. On pourra utiliser un pinceau très fin (à poils artificiels et non en martre : poils trop rêches). Une fois l'abdomen nettoyé, il faut le colorer au noir de chlorazol. Nettoyage à l'alcool et installation sous lame et lamelle à côté des pièces génitales ou bien à étaler avec les pièces génitales sous la même lamelle...

Ce n'est pas très difficile : juste une question d'habitude.

<sup>1</sup> [ctautel@free.fr](mailto:ctautel@free.fr)

## Technique plus simple, trouvée sur un forum d'entomologie (auteur inconnu)

- ++ Couper l'abdomen.
  - ++ Le plonger dans la potasse froide.
  - ++ Porter à ébullition pendant quelques instants (laisser un peu plus longtemps si l'organe est gros).
  - ++ Rincer à l'eau distillée.
  - ++ Dans l'eau et sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince fine, séparer les genitalia des débris organiques (intestins, muscles etc..) puis écarter les valves, sans séparer pour autant le pénis au risque de le perdre.
  - ++ Plonger dans la potasse froide.
  - ++ Porter à ébullition quelques instants de façon à parfaire le nettoyage.
  - ++ Rincer dans plusieurs bains d'eau successifs pour éliminer les traces de potasse.
  - ++ Déshydrater dans des bains d'alcool successifs.
  - ++ Faire un bain dans l'essence de lavande plus d'une demi-heure (les genitalia peuvent rester dans ce bain autant de temps que nécessaire).
- On finit par le montage entre LPO et LCO dans le BC (le bain dans l'essence de lavande permet d'imprégner les pièces de solvant de ce baume pour faciliter l'étape suivante).
- ++ Placer une petite goutte de BC au centre de la LPO, suffisante pour qu'ensuite celui-ci s'étale sous la LCO entière.
  - ++ Mettre les pièces génitales dans le BC.
  - ++ Séparer le pénis à ce niveau-là, soit partiellement soit totalement.
  - ++ Disposer correctement les pièces, les valves de chaque côté de la pièce centrale.
  - ++ Placer la LCO en évitant le plus possible les bulles.
  - ++ Rédiger les étiquettes.

### Bibliographie

CARAYON J., 1969 - "*Emploi du noir de chlorazol en anatomie microscopique des insectes*", Annales de la Société Entomologique de France, (N. S.), 5 (1), 179 : 193.

GIBEAUX C., - « *Les Genitalia mâle et femelle, Les principaux noms utilisés dans leur étude (Lepidoptera)* », Ent. gall. 1 (2), 110 : 115.

## Technique personnelle, revue vers encore plus de simplification

Après avoir lu très attentivement tout ce qui était écrit sur ce sujet, nous avons commencé à appliquer une méthode hybride, en essayant de simplifier au maximum toutes ces étapes assez lourdes et chronophages, tout en gardant à l'esprit que le résultat serait sans doute moins bon qu'avec des protocoles qui ont fait leurs preuves.

### NOTRE MODE OPÉRATOIRE

#### PHASE DE NETTOYAGE ET DE PRÉLÈVEMENT

- ++ Couper l'abdomen.
- ++ Le plonger dans la potasse froide et le laisser macérer durant 6 à 10 jours selon la taille de l'insecte. *Nous avons choisi cette option afin d'éliminer au maximum l'utilisation de potasse très chaude, source de danger et d'accident. Précisons également que nous avons choisi d'oeuvrer sur 6 insectes (5 papillons et un hyménoptère) conservés en papillote depuis quasi 20 ans, ce qui n'est pas la solution idéale ; nous avons le sentiment que l'utilisation de matériel frais facilite le travail.*
- ++ Rincer à l'eau distillée.
- ++ Dans l'eau et sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une pince fine, séparer les genitalia des débris organiques (intestins, muscles etc..) puis écarter les valves, sans séparer pour autant le pénis au risque de le perdre.
- ++ Remettre dans quelques gouttes la potasse froide, et porter à ébullition quelques instants de façon à parfaire le nettoyage.
- ++ Rincer dans plusieurs bains d'eau successifs pour éliminer les traces de potasse.

#### PHASE DE DÉSHYDRATATION

- ++ Poser les pièces prélevées au centre d'une LPO et les étaler au mieux possible, dans une position « naturelle ».
- ++ Couvrir avec une seconde LPO et serrer à l'aide de 2 pinces à linge en bois, posées aux extrémités des LPO.
- ++ Plonger l'ensemble dans un bain d'alcool à 95°, et le laisser macérer durant plusieurs jours

Nous avons travaillé sur 6 insectes différents, et les 6 « montages » sont restés dans le bain alcoolique durant 15 jours.

#### PHASE DE PRÉPARATION AU MONTAGE

- ++ Sortir les LPO du bain alcoolique et laisser égoutter.
- ++ Séparer les 6 LPO avec beaucoup de précaution et transférer les pièces au centre de LPO propres, à l'aide d'une très fine pince (c'est assez facile car l'ensemble est rigidifié par la déshydratation).
- ++ Sur 2 LPO (1), poser une goutte d'eau durant 5 minutes, puis éponger.
- ++ Sur les 2 suivantes (2), poser une goutte de xylène et éponger le surplus après 2 ou 3 minutes.
- ++ Sur les 2 dernières (3), poser une goutte d'isopropanol et éponger le surplus après 2 ou 3 minutes.

#### PHASE DE MONTAGE

**(1)** Les pièces réhydratées sont montées au PVALPh ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles. *Un rapide contrôle au microscope montrera qu'il en subsiste malgré tout ; chauffer et refroidir brusquement : elles disparaissent comme par magie.*

**(2)** Les pièces traitées au xylène sont montées au BC ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles. *Un rapide contrôle au microscope montre des bulles évidentes ; un coup d'oeil le lendemain nous apprend qu'elles ont complètement disparu, même dans le bout d'abdomen.*

**(3)** Les pièces traitées à l'isopropanol sont montées à l'Euparal ; poser une goutte de milieu, et disposer correctement les pièces sous la loupe ; placer la LCO en évitant le plus possible les bulles. *Un rapide contrôle au microscope montre des bulles un peu partout autour des pièces ; nous ne désespérons pas car l'Euparal est aussi très avide d'oxygène et a le pouvoir d'absorber l'air présent ; un coup d'oeil le lendemain nous indique qu'elles ont complètement disparu également.*

**Nous considérons donc cette expérimentation comme une réussite totale.**