

BULLETIN MENSUEL

DE LA

SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON

FONDÉE EN 1822

DES

SOCIÉTÉS BOTANIQUE DE LYON, D'ANTHROPOLOGIE ET DE BIOLOGIE DE LYON
RÉUNIES

et de leurs GROUPES de ROANNE, VIENNE et VILLEFRANCHE-SUR-SAONE

Secrétaire général : M. le D^r BONNAMOUR, 49, avenue de Saxe ; Trésorier : M. P. GUILLEMOZ, 7, quai de Retz

SIÈGE SOCIAL A LYON : 33, rue Bossuet (Immeuble Municipal)

ABONNEMENT ANNUEL	{	France et Colonies Françaises	15 francs
		Etranger.. . . .	20 —
2.397 Membres		MULTA PAUCIS	Chèques postaux c/c Lyon, 101-97

PARTIE ADMINISTRATIVE

ORDRES DU JOUR

Séance du Conseil d'administration du Mardi 12 Mars, à 20 h. 30

1^o Vote sur l'admission de :

M. Doneaud (Georges), 156, rue Vendôme, Lyon, parrains MM. Guillaud et Duroissay. — M. Dussert (Abel), professeur au lycée, directeur du Musée J.-B. Rames, Aurillac (Cantal), parrains MM. Riel et Guillemoz. — M. Leys, 49, boulevard Léopold, Gand (Belgique), parrains MM. Riel et Jacquet. — M. Maréchal, président de la Société d'Horticulture, Viticulture et Apiculture de Dôle, Azans par Dôle (Jura), parrains MM. Riel et Guillemoz. — M. Latte (Louis), 20, cours Morand, Lyon, parrains MM. L. Chrétien et L. Blandin. — M. Granjard (Henri), professeur au Lycée, Roanne (Loire), parrains MM. Combet et Larue. — M. Navel (A.), 55, rue de Trion, Lyon, parrains MM. Escalier et Josserand. — M. Muller (Victor), 1, rue Beaulieu, Riorges (Loire), parrains MM. Larue et Mury. — M. Brossard (René), 17, rue François-Badot, Toul (Meurthe-et-Moselle), *Stéréophographie d'échantillons d'histoire naturelle*, parrains M^{lle} Albessard et M. Josserand. — Fan Memorial Institute of Biology, 3, Wen Tsin Chieh, Peiping (China). — M. Tarnogradsky (Prof. D. A.), 9, rue de Borodine, Orjani Ridsé (U. R. S. S.). *Biologie*. — M. Soyer (Bernard), professeur agrégé d'Histoire naturelle au Lycée, 2, avenue Félix-Faure, Nice (Alpes-Maritimes). *Biologie des Hyménoptères vespiformes*. — M. Patte (Etienne), professeur à la Faculté des Sciences, Poitiers (Vienne),

PARTIE SCIENTIFIQUE

SECTION BOTANIQUE

Séance du 10 Décembre 1934

Démonstration pratique sur l'application d'un réactif vital à l'étude de la cellule végétale et de sa nécrobiose

Par M. A. TRONCHET

Il s'agissait, dans cette démonstration pratique au microscope, d'étudier à l'aide de réactifs vitaux la structure des cellules végétales vivantes et leur nécrobiose, c'est-à-dire les modifications qu'elles subissent en passant de la vie à la mort.

Qu'appelle-t-on réactif vital ? Tout d'abord, on peut entendre par là, un milieu dans lequel les cellules vivantes peuvent continuer à vivre sans subir d'altérations appréciables dans leur structure ni de perturbation physiologique brutale. Un exemple d'un tel milieu est le liquide de Ringer utilisé dans la première partie de la démonstration. Mais on réserve habituellement l'expression *réactif vital* pour des milieux composés de manière à différencier immédiatement, ou presque immédiatement, les cellules vivantes des cellules mortes et permettant l'étude facile des modifications nécrobiotiques. Cette acception s'applique à certains mélanges colorants tels que le réactif de Becquerel (1) ou encore le réactif dit de Ruzicka, utilisé pour la démonstration dans des conditions précisées plus loin.

L'exemple choisi est l'épiderme des écailles du bulbe d'Oignon (*Allium Cepa*), matériel classique. Il est facile de détacher cet épiderme car les cellules qui le constituent adhèrent beaucoup plus fortement entre elles qu'avec les tissus sous-jacents. Chacune de ces cellules est limitée par une membrane cellulosique constituant une sorte de squelette rigide autour du corps cellulaire. Cette membrane ne forme pas une enveloppe étanche : ses faces latérales et interne sont perméables aux solutions et, de plus, percées de minuscules orifices permettant la communication avec les cellules voisines. A l'intérieur du compartiment ainsi délimité on distingue d'abord un corps plus réfringent, ovoïde ou sphérique : le noyau, entouré d'une mince pellicule (membrane nucléaire) et formé d'une matière finement granuleuse contenant un ou plusieurs corpuscules arrondis plus réfringents (nucléoles). On observe en outre une matière homogène (cytoplasme) dans laquelle se trouvent divers éléments dont il sera question plus loin. Ce cytoplasme n'occupe qu'une assez faible partie de la cavité cellulaire : il forme à la périphérie de celle-ci, contre la paroi, une couche de faible épaisseur à l'intérieur de laquelle est ordinairement situé le noyau. Cette couche cytoplasmique pariétale enveloppe une grande cavité ou vacuole remplie d'un liquide (suc cellulaire) renfermant en dissolution diverses substances cristalloïdes et colloïdales, et souvent traversée par de minces trabécules formés de cytoplasme. Dans certaines cellules le noyau, au lieu d'être rejeté contre la paroi, se trouve au centre de la cavité ; il est alors entouré par une couche de cytoplasme périmoléculaire reliée au cytoplasme pariétal par de minces trabécules s'irradiant autour du noyau à travers la vacuole.

La substance cytoplasmique est un milieu optiquement vide tant que la cellule est vivante, mais renferme divers éléments figurés dont nous allons maintenant parler. On observe tout d'abord de petites sphérules facilement visibles grâce à leur très vive réfringence : ce sont des granulations lipoides. D'autres éléments diffèrent très peu du cytoplasme par leur réfringence et ne peuvent être distingués que par une observation très attentive : ils constituent le chondriome. Ces éléments ont la forme de minuscules granulations (mitochondries granuleuses), ou de fuseaux, de bâtonnets, ou de filaments parfois très allongés (chondriocontes). Certains de ces éléments sont plus épais ou pourvus de renflements pleins ou de vésicules : ce sont des leucoplastes (le contenu des vésicules est de nature indéterminée).

Le cytoplasme est le plus souvent le siège d'un mouvement plus ou moins rapide de circulation rendu visible grâce au déplacement des granulations lipoides et des mitochondries granuleuses entraînées par le courant cytoplasmique. Les chondriocontes et les leucoplastes, par suite de leurs dimensions et de leur forme, subissent des déplacements moins rapides et peuvent même paraître immobiles. Un faible mouvement ondulatoire des granulations ou mouvement brownien peut coexister avec le mouvement de circulation ainsi que l'ont montré, pour d'autres matériels, LAPICQUE (5), NEUMANN (9), MARTENS et CHAMBERS (8), mais paraît surtout s'accroître au moment où la vitalité de la cellule s'altère. Cette accentuation du mouvement brownien est alors liée à une modification de la viscosité du cytoplasme et constitue un indice de nécrobiose (GUILLIERMOND, 2).

Pour observer vitalement la structure qui vient d'être décrite, il est nécessaire d'utiliser un milieu capable de la conserver sans altérations. Certains éléments sont en effet très fragiles. C'est ainsi que ceux que l'on réunit sous le nom de chondriome, peuvent se vésiculiser et même éclater si l'on place le lambeau d'épiderme dans de l'eau pure ou, d'une façon générale, dans une solution trop faiblement concentrée qui provoque une turgescence exagérée de la cellule. Une solution trop fortement concentrée produit le phénomène inverse de la plasmolyse, c'est-à-dire un appauvrissement en eau de la vacuole et une contraction consécutive du contenu cellulaire. Pour éviter toute altération, il faudra donc employer une solution dosée de manière à ne produire, ni excès de turgescence, ni plasmolyse (solution isotonique).

D'autre part, des recherches physiologiques déjà anciennes (RINGER, 12 ; LOCKE, 7 ; OSTERHOUT, 10, 11 ; LOEB, OSTWALD, etc., voir aussi LAPICQUE, 6) ont établi une notion très importante récemment étendue aux cellules végétales (GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL, 2, 3) : celle de la nécessité de certains ions (les ions Na, K et Ca) en proportion déterminée pour le maintien des conditions normales de la vie. Ces ions, agissant séparément, sont toxiques, mais chacun d'eux est antitoxique pour les deux autres et ils doivent exister dans un certain rapport qui caractérise ce qu'on appelle une *solution équilibrée*. Tels sont les liquides de Ringer et de Locke-Ringer depuis longtemps utilisés en physiologie animale. Ces solutions appliquées à l'examen vital des cellules végétales ont donné de très bons résultats et peuvent notamment conserver très longtemps le chondriome, mais il convient, tout en respectant la proportion des sels, de chercher par tâtonnements la concentration optimale pour le matériel étudié. Elles doivent, d'autre part, être alcalinisées. Les cellules ne peuvent vivre en effet qu'entre des limites données d'acidité et d'alcalinité. Ces limites peuvent être plus ou moins larges suivant les cas mais l'optimum est situé, en général, plus près de la limite alcaline que de la limite acide.

La première partie de la démonstration a été consacrée à l'examen vitale de lambeaux d'épiderme interne des écailles d'oignon dans le liquide de Ringer. Pour préparer celui-ci, on peut faire d'abord une solution de réserve ainsi constituée :

Eau distillée	100 centimètres cubes
Chlorure de sodium	2 gr. 40
Chlorure de potassium.	0 gr. 03
Chlorure de calcium <i>sec</i>	0 gr. 04

On ajoute, pour alcaliniser, 0 gr. 03 de bicarbonate de soude. En ce qui concerne le chlorure de calcium, il y a lieu de tenir compte dans les pesées que ce sel est le plus souvent utilisé sous la forme hydratée : $\text{CaCl}^2 \cdot 6 \text{H}^2\text{O}$. Le liquide employé pour l'observation vitale est préparé en diluant cette solution dans la mesure nécessaire pour ne provoquer aucune plasmolyse, c'est-à-dire, dans le cas qui nous occupe, en ajoutant trois à quatre parties d'eau distillée à une partie de solution de réserve. Le milieu d'observation ainsi constitué est capable de conserver longtemps les cellules épidermiques d'oignon sans altération du chondriome ni des mouvements cytoplasmiques.

La seconde partie de la démonstration comportait l'emploi d'un réactif permettant de différencier, par une réaction colorante, les cellules vivantes et les cellules mortes ou en voie de nécrobiose.

Le réactif employé est basé sur ce que l'on peut appeler le phénomène de Ruzicka (13). Cet auteur, pour différencier les cellules vivantes et mortes, utilisait un mélange équimoléculaire de rouge neutre et de bleu de méthylène. Ses expériences ont porté sur les matériaux les plus divers (Rhizopodes, Infusoires, Rotifères, cellules vibratiles de la Grenouille, fibres musculaires dissociées, Diatomées, Chlorophycées, Bactéries, Hyphomycètes, etc.). Il observait que ces matériaux se colorent franchement en rouge lorsqu'ils sont vivants, en bleu lorsqu'ils meurent, ou bien prennent une teinte violacée qui penche vers le rouge pendant la vie, le bleu après la mort. En ce qui concerne les cellules végétales, cette remarque de Ruzicka paraît assez exacte en général et se vérifie en particulier pour l'épiderme d'oignon.

Dès que l'on utilise un réactif vital comportant des colorants, une question importante se pose : celle de leur toxicité. De nombreux auteurs (Pfeffer, Martinotti, Galéotti, Overton, Höber, Fischel, etc.) ont expérimenté systématiquement l'emploi sur la cellule vivante d'un très grand nombre de matières colorantes. On n'a pu retenir qu'un petit nombre d'entre elles : ce sont les colorants vitaux. Parmi eux le rouge neutre et le bleu de méthylène sont les plus importants et aujourd'hui encore les plus couramment employés. La toxicité des principaux colorants vitaux a été étudiée vitalement d'une façon très précise par Guilliermond chez les Cryptogames, Guilliermond, Dufrenoy et Labrouste (4) chez les Phanérogames. Il résulte de leurs expériences que la toxicité du rouge neutre est très faible et devient même pratiquement nulle à la dose de 0 gr. 005 %. Le bleu de méthylène est malheureusement beaucoup plus toxique et devrait être employé à un degré de dilution très élevé si l'on voulait préserver les cellules vivantes de toute altération.

Le réactif utilisé est une solution dans l'eau de fontaine de rouge neutre et de bleu de méthylène mélangés à parties égales, chacun des deux colorants s'y trouvant à la dose de 1 à 2 centigrammes pour 100 grammes, suivant l'intensité et la rapidité de coloration que l'on veut obtenir. En raison de la toxicité des colorants, particulièrement du bleu de méthylène, ce réactif

vital, il convient de le dire, est très imparfait et ne saurait être comparé au liquide de Ringer pour la conservation des cellules vivantes. Mais le but recherché est différent : il s'agit d'obtenir un contraste de coloration nettement marqué entre les cellules mortes et les cellules vivantes, et ces dernières, bien qu'elles puissent subir des altérations assez rapides, principalement dans leur chondriome, résistent assez longtemps pour que la coloration recherchée se manifeste avec une netteté parfaite.

Lorsqu'on plonge un lambeau d'épiderme d'oignon dans ce réactif, le suc cellulaire qui remplit la vacuole des cellules vivantes se colore peu à peu, en quelques minutes, en rose, rouge clair ou légèrement violacé. Le cytoplasme et le noyau restent incolores tant que la cellule vivante est saine. Dans le lambeau d'épiderme ainsi traité on peut voir que certaines cellules présentent une coloration et un aspect très différents : leur cytoplasme est trouble, fortement granuleux, souvent alvéolisé, ou plus ou moins contracté, et coloré avec une intensité variable en bleu. Le noyau est lui-même coloré en bleu, bleu-verdâtre ou plus ou moins violacé, les nucléoles sont teints en bleu plus vif. Les cellules qui présentent ces caractères sont mortes. Elles ont été tuées par écrasement ou dessiccation, ou parce qu'elles ont été déchirées, blessées ou sectionnées au moment où on a arraché l'épiderme. La teinte bleu-verdâtre de leur contenu et son aspect de gelée granuleuse contrastent fortement avec la coloration rouge et l'aspect beaucoup plus homogène des cellules vivantes.

Si maintenant on replace le lambeau d'épiderme dans un tube contenant du réactif et si, par addition d'un poison (alcool, sublimé, etc), ou par l'action de la chaleur, on tue les cellules restées vivantes, la coloration rouge qu'avait prise leur suc cellulaire disparaît plus ou moins rapidement tandis que le noyau se colore, parfois en rouge au début, puis en bleu-violacé ou en bleu. En même temps le cytoplasme se coagule, devient granuleux, acquiert parfois un aspect alvéolaire et se colore finalement plus ou moins en bleu. On peut suivre facilement ces modifications nécrobiotiques en plaçant de temps en temps le lambeau d'épiderme sous le microscope, entre lame et lamelle, dans une goutte du réactif.

En résumé, des deux liquides employés dans cette démonstration l'un, la solution de Ringer, permet d'observer les cellules vivantes sans amener d'altérations appréciables dans leur structure ; l'autre, le mélange rouge neutre-bleu de méthylène, a une composition incompatible avec le maintien prolongé de la vie des cellules mais ne les tue pas immédiatement et fait apparaître dans l'épiderme un contraste de coloration très net entre ses éléments cellulaires suivant qu'ils sont vivants ou morts.

(1) BECQUEREL (P.) — Observations sur la nécrobiose du protoplasme végétal à l'aide d'un nouveau réactif vital (*Compte rendu Acad. Sc.*, 1923).

(2) GUILLIERMOND (A.) — Recherches ultramicroscopiques sur les cellules végétales (*Rev. gén. Bot.* p. 42, 1930).

(3) GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTÉPOL. — *Traité de Cytologie végétale*, 1 vol. 1195 p., Le François, Paris, 1933.

(4) GUILLIERMOND (A.), DUFRENOY (J.) et LABROUSTE. — Germination des graines de tabac en milieux additionnés de rouge neutre et coloration de leur vacuome pendant la croissance (*Compte rendu Acad. Sc.*, t. CLXL, p. 1439, 1930).

(5) LAPICQUE (L.) — Sur les corpuscules qui montrent l'agitation protoplasmique chez les Spirogyres (*Compte Rendu Soc. de Biol.*, t. LXXXVII, 1922).

(6) LAPICQUE (L.) — *Les échanges de liquide : échanges cellulaires* (Cours publié par Cherbuliez, Gauthier-Villars, Paris, 1926).

(7) LOCKE. — *Centralblatt für Physiologie*, vol. XIV, p. 670-672 (1900) et vol. XV, p. 490 (1901).

(8) MARTENS (P.) et CHAMBERS (R.). — Etudes de microdissection, les poils staminaux de *Tradescantia*. (*La Cellule*, XVI, fasc. 2, 1932).

(9) NEUMANN (H.). — Brownsche Molekularbewegung in Pflanzenreich (*Beih. Bot. Centr.*, 40, Abl. I, 1924).

(10) OSTERHOUD (W. J. V.). — The permeability of protoplasm to ions and the theory of antagonism (*Science*, 35, 1912).

(11) OSTERHOUD (W. J. V.). — The permeability of living cells to salts in pure and balanced solutions (*Science*, 34, 1911).

(12) RINGER (S.). — *Journal of physiology*, vol. III, p. 380-393 (1882) et vol. IV, p. 29-42 et 221-225 (1883).

(13) RUZICKA (V.). — Ueber tinktorielle Differenzen zwischen lebenden und abgestorbenen protoplasma (*Archiv. ges. Physiol.*, ch. VII, p. 437-531, 1905).

SECTION ENTOMOLOGIQUE

Séance du 20 Février.

Rectification

A la séance du 21 novembre 1934, le D^r E. ROMAN a présenté un exemplaire de *Dorytomus occalescens* Gyll (Col. Curculionides), capturé à Thil (Ain), lors de l'excursion entomologique de la Linnéenne du 22 mai 1932. Dans le compte rendu de cette sortie¹, cet Insecte avait été cité par erreur sous le de *D. affinis* Payk. Cette détermination, confirmée par M. A. HUSTACHE, le distingué spécialiste des Curculionides, révèle une espèce rare et intéressante pour la région lyonnaise. Toutefois, bien que non citée dans le Catalogue de GUILLEBEAU, il est peu probable qu'elle soit nouvelle pour le département ; suivant M. HUSTACHE², elle a été trouvée par ABEILLE au bord de la rivière d'Ain ; il serait extraordinaire que cette indication se rapporte à la partie de la vallée qui arrose le Jura, où les entomologistes n'ont guère chassé.

A propos de « *Julodis onopordi* » F.

Par L. SCHAEFER

Dans ce *Bulletin*, j'ai dit (octobre 1934, p. 128), que la forme française appartenait à la forme typique de Fabricius, suivant en cela DE MARSEUL, KERREMANS et J. OBENBERGER, et se retrouvait en Afrique du Nord.

Cette affirmation a été relevée par A. THÉRY (décembre 1934, p. 160), qui considère que le type doit plutôt être originaire de Barbarie, et qu'en outre aucune race ne saurait être commune à la France et à l'Algérie.

Pour tenter d'éclaircir la question de synonymie, j'ai profité de l'obligeance de M. K.-L. HENRIKSEN pour me faire comparer le *Julodis* de La Couronne avec l'espèce de Fabricius. La collection du Musée de l'Université de Copenhague possède l'exemplaire du type. Il est étiqueté : Tunis (Wahl). FABRICIUS avait donc bien corrigé la localité donnée dans la *Mantissa Insectorum*. Ce type s'accorde bien avec la forme française en ce qui concerne l'aspect des bandes pubescentes, mais les intervalles ne présentent aucune légère côte, alors que chez les exemplaires de La Couronne, comme chez ceux de Saint-Mandrier, ils sont toujours très légèrement, mais distinctement, costiformes. La forme française diffère donc bien du véritable *onopordi* F. ainsi que A. THÉRY l'avait prévu.

¹ *Bulletin mensuel de la Soc. Linn. de Lyon*, 2^e année, n^o 5, mai 1933, p. 71.

² Curculionides gallo-rhénans, 7^e partie in. *Ann. Soc. entomol. France*, vol XCIX, 1930, p 177.