

BULLETIN MENSUEL
DE LA
SOCIÉTÉ LINNÉENNE DE LYON

FONDÉE EN 1822

RECONNUE D'UTILITE PUBLIQUE PAR DECRET DU 9 AOUT 1937
des SOCIÉTÉS BOTANIQUE DE LYON, D'ANTHROPOLOGIE ET DE BIOLOGIE DE LYON
REUNIES

et de leurs GROUPES REGIONAUX : ROANNE, BOURGOIN, VALENCE, etc.

Secrétaire général: M. J. FIASSON, 48, rue Tête-d'Or, Lyon 6^e.
Trésorier: M. A. PONCHON, 30, rue Malesherbes, Lyon 6^e.

SIÈGE SOCIAL A LYON : 33, rue Bossuet, 6^{me} (Immeuble Municipal)

ABONNEMENT ANNUEL	France et Colonies Françaises	300 francs
C. C. P. Lyon 101-98	Etranger	600 —

PARTIE ADMINISTRATIVE

ORDRES DU JOUR

ASSEMBLEE GENERALE ORDINAIRE :

Mardi 13 Septembre, à 21 h. 30, au siège

Approbation des comptes et du bilan au 31 Décembre 1948.

Rapport du censeur. — Nomination du censeur. — Questions diverses.

CONSEIL D'ADMINISTRATION : Mardi 13 Septembre, à 20 h. 15

Admission de :

M. Léon QUOEX, 48, rue de Bonnel, Lyon, parrains MM. Coquillat et Ponchon. — Mme BERGER-DELUERMOZ, 15 quai Général Sarrail, Lyon, parrains MM. Fiasson et Denninger. — M. Jean DELUERMOZ, 23, chemin Vauché, St-Rambert-l'Île-Barbe, parrains MM. Pouchet et Roman. — Mme S. LACHARRIÈRE, 41, rue Waldeck-Rousseau, Lyon, parrains MM. Pouchet et Coquillat. — M. Michel LETRONE, 53, rue Dedieu, Villeurbanne, parrains MM. Fiasson et Gourc. — M. Gaston BOUILLLOUX, 2, rue Mansard, Lyon, parrains MM. Fiasson et Gourc. — M. Pierre MAGNARD, 13, rue Cléberg, Lyon, parrains MM. Lacombe et Sevignon. — Mlle PERRET Bernadette, 21, avenue Félix Faure, Lyon, parrains MM. Ponchon et Graisely. — Mlle LÉVÊQUE, 153, chemin Barthélemy Buyer, Lyon, parrains Mlles A. et L. Tourlionnas. — M. Armand LIMOUZIN, 6, rue Coustou, Lyon, parrains MM. Pouchet et Ponchon. — M. Michel BESSEYRE, 33, rue Pernon, Lyon, parrains MM. Dailly et Denninger. — M. Auguste LIROT, 28, boulevard des Brotteaux, Lyon, parrains MM. Pouchet et Coquillat. — Mlle Germaine GEAIS, 4, rue Duhamel, Lyon, parrains Mlle Prudent et M. Fiasson. — Mme J. LAUZIER, 7, rue Romarin, Lyon, parrains MM. Denninger et Ponchon. — M. GINOT, 18, avenue de Saxe, Lyon, parrains MM. Fiasson et Graisely. — M. Boris TCHOURAKOFF, 27, rue St-Michel, Lyon, parrains MM. Pouchet et Coquillat. — M. Philippe CHARBONNIER, 18, rue Royale, Lyon, parrains MM. Fiasson et Lacombe. — Mme BURRI, 11, rue Cronstadt, Lyon, parrains MM. Denninger et Bartschi. — COLLÈGE MODERNE, rue Chaponnay, Lyon.

M. G. BOBENRIETH, cultivateur-grainier, 12, quai Victor Augagneur, Lyon, parrains MM. Coquillat et Néel. — ECOLE COLONIALE D'AGRICULTURE, Zoologie et

PARTIE SCIENTIFIQUE

Nouveaux modes d'emploi en Mycologie de deux réactifs permettant la coloration en masse des noyaux cellulaires : le CARMIN ACETIQUE et le MELANGE DE GIEMSA

par R. KÜHNER.

Diverses méthodes de coloration régressive permettent en général de teindre intensément et électivement les noyaux de champignons convenablement fixés, et par conséquent, de les mettre nettement en évidence malgré leur petite taille (1). Citons la méthode de GRAM-NEWTON au violet-cristal (2), et la classique méthode à l'hématoxyline ferrique, que nous employons toutes deux couramment ; pour obtenir les meilleurs contrastes avec cette dernière, on fera bien de soumettre, avant coloration, le matériel fixé, à une hydrolyse par l'acide chlorhydrique normal chaud (60° C.) pendant 15 à 30 minutes ou davantage, et de régresser par l'alcool picriqué les préparations surcolorées ; en raison de l'attrait que présentent pour les moisissures les solutions aqueuses ou glycerinées d'hématoxyline, il est commode d'utiliser des solutions dans l'alcool à 70°, comme DOBELL l'a déjà recommandé pour l'hématéine.

L'inconvénient des méthodes régressives est de ne pouvoir être commodément utilisées que sur des coupes très fines, telles que celles qu'on réalise au microtome après inclusion à la paraffine, ou au moins sur du matériel très dissocié ; si l'on opère avec des pièces insuffisamment minces, la régression se fait à des vitesses très différentes dans leurs diverses parties, et le résultat final est fréquemment trop inégal.

Le carmin acéto-ferrique ne présente pas cet inconvénient ; nous avons montré (2) avec quelle facilité il permet de mettre en évidence les noyaux des Mycènes, même sur matériel d'herbier convenablement conservé, à la seule condition que le champignon bien frais ait été desséché à une vitesse suffisante. Malheureusement, dans la plupart des autres genres d'Agarics, le carmin acéto-ferrique ne nous a donné aucune coloration des noyaux, du moins des noyaux au repos des articles ordinaires du carpophore.

Pour ce qui est des basides, il arrive même que ce réactif colore tout autre chose que les noyaux ; dans quelques champignons, en effet, il colore fortement une multitude de granulations dont la baside est farcie. Nous avons utilisé (3) cette particularité pour délimiter un ensemble des *Lyophyllés*, que nous croyons toujours naturel ; cette réaction est précieuse puisqu'elle a lieu, non seulement sur le frais, mais très généralement aussi sur matériel sec, même vieux de plusieurs années ; toutefois, ayant relevé sur matériel d'herbier, quelques cas d'inconstance, apparemment intra-spécifique, de la réaction, nous conseillons, en présence d'un résultat négatif sur exemplaire sec, de ne rien affirmer avant d'avoir traité au carmin acéto-ferrique des basides vivantes. Il est également essentiel de se souvenir que la netteté du résultat varie beaucoup avec le carmin acétique utilisé ; nous ignorons pourquoi nous n'avons jamais pu obtenir, depuis que nous travaillons

à Lyon, d'aussi belles colorations au carmin acétique que celles que nous obtenions autrefois à Paris, du moins en employant la technique simple que nous avons décrite.

Néanmoins, nous avons obtenu tout récemment des résultats très satisfaisants, même brillants, sur matériel sec des *Tephrophana atrata* et *rancida* en faisant bouillir, au préalable, pendant quelques minutes les fragments secs dans un tube à essais ; nous avons essayé avec succès l'ébullition dans l'eau seule et l'ébullition dans l'acide acétique à 45 %, additionnée ou non d'acétates ; l'ébullition dans une solution d'acétate de cuivre dans l'acide acétique à 45 % permet peut-être les plus belles colorations. Avec les *T. atrata* et *rancida*, ce traitement préalable nous a permis d'obtenir la teinture intense des granules basidiens caractéristiques, sans intervention de l'aiguille de fer ; il suffisait de chauffer assez longuement sur lame, dans le carmin acétique, en renouvelant le colorant. Dans un cas plus difficile, l'agitation du fragment à étudier avec une aiguille de fer, jusqu'à production de nuages noirs dans la goutte de carmin chaud, nous a permis d'obtenir une coloration marquée des granules.

Nous conseillons d'observer le résultat de la réaction dans une goutte de sirop d'hydrate de chloral préparé au moment de l'emploi ; les avantages de ce milieu sont multiples ; par sa consistance il facilite la dissociation ; par son indice de réfraction relativement élevé, il noie les détails non colorés de la préparation, de sorte que les granules intensément teintés ressortent sur le fond de façon particulièrement frappante ; leur coloration y persiste pendant des heures si la solution de chloral a été fraîchement préparée.

Le mélange de GIEMSA (GIEMSA lent, R. A. L.) est infiniment préférable au carmin acétique lorsqu'il s'agit d'obtenir une coloration nucléaire en masse, car il donne d'excellents résultats avec la plupart des espèces, et notamment avec une foule de celles qui se montrent rebelles au carmin acétique.

Nous avons déjà préconisé (4) l'emploi du GIEMSA pour la coloration des noyaux oïdiens après fixation par la solution aqueuse saturée de bichlorure de mercure, mais cette méthode nous a donné des résultats médiocres, sinon nuls, pour les basides et les hyphes.

La méthode que nous préconisons aujourd'hui est inspirée de celle qu'utilisent quelques cytologistes pour mettre en évidence, chez les bactéries, des formations que divers Auteurs comparent aux noyaux ou à certaines parties des noyaux des animaux et végétaux supérieurs ; son originalité réside dans le fait, qu'avant coloration au GIEMSA, le matériel est soumis à une hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique normal, à la température de 60° C. ; cette hydrolyse fait perdre au cytoplasme l'affinité qu'il présente pour certains colorants du mélange de GIEMSA, tout en préparant, si elle n'a pas été trop poussée, une coloration intense des noyaux. Cette technique particulière a été imaginée en 1937 par PIEKARSKI, si nous en croyons ROBINOW qui l'a employée systématiquement pour l'étude de la structure des cellules bactériennes fixées aux vapeurs d'acide osmique (5).

Le choix des fixateurs nous a paru jusqu'ici assez limité ; l'acide osmique en vapeurs et le formol nous ont donné de mauvais résultats pour les basides et les hyphes ; même après hydrolyse, le cytoplasme

du matériel ainsi fixé se colore trop fortement au GIEMSA, et les noyaux ne ressortent pas avec une couleur différente. Nous n'avons encore retenu comme utilisables que le sublimé en solution aqueuse saturée, l'acide acétique (nous avons essayé un mélange à parties égales d'acide acétique glacial et d'eau) et l'alcool absolu.

Le plus souvent nous fixons à l'alcool absolu, dans lequel nous laissons les pièces quelques minutes (5 à 15 par exemple) ; l'alcool nous a donné de belles préparations, tant d'éléments hyméniens que d'hyphes mycéliennes ; nous le recommandons particulièrement pour les mycéliums aériens, dont les feutrages ne se laissent que très difficilement pénétrer par les solutions aqueuses. Par contre, pour les mycéliums développés à l'intérieur des solutions nutritives, il est souvent préférable de transférer ceux-ci directement dans la solution chlorhydrique chaude, sans fixation préalable ; cette méthode particulièrement simple et rapide a également permis à notre collaborateur J. BOUDIN d'obtenir des colorations très électives des noyaux des spores.

Fixation mise à part, voici les détails de la technique que nous utilisons actuellement :

1° Immerger le fragment, fixé ou non, dans un tube à fixation contenant de l'acide chlorhydrique normal, à la température de 60° C., et l'y laisser pendant un temps qui dépend de l'espèce de champignon et du type d'article à étudier, mais qui semble en général devoir être compris entre 5 et 20 minutes ; très souvent on obtient les meilleures colorations après une hydrolyse de 10 minutes.

2° Vider la solution acide et la remplacer par de l'eau froide que l'on changera à plusieurs reprises, pendant 15 minutes.

3° Vider l'eau et la remplacer par de l'alcool absolu (éthylrique ou méthylrique) que l'on changera une ou deux fois, de manière à bien chasser l'eau.

4° Vider l'alcool et verser sur le fragment de champignon trois ou quatre gouttes de mélange de GIEMSA ; laisser en contact pendant 15 ou 30 minutes au moins ; on peut prolonger l'imprégnation pendant des heures sans inconvénient.

5° Verser 4 ou 5 cc. d'eau dans le tube contenant fragment de champignon et mélange de GIEMSA, et homogénéiser en inclinant et redressant doucement le tube ; ne pas procéder violemment et ne pas introduire d'agitateur car le mélange précipite très facilement. Laisser en contact au moins 30 minutes, mieux une heure ou davantage. Si l'observation ne peut être faite immédiatement, on laissera les pièces dans la solution aqueuse du mélange colorant ; elles peuvent y rester sans inconvénient pendant deux ou trois jours par exemple, au moins dans certains cas.

6° Placer le fragment de champignon sur une lame de verre de préparation microscopique, et en l'y maintenant avec la pointe d'une aiguille, le passer quelques secondes sous le jet d'eau d'un robinet, de manière à le débarrasser des précipités qui se forment inévitablement lorsqu'on ajoute de l'eau au mélange de GIEMSA lent.

7° Couvrir d'une lamelle. Au besoin dissocier par percussion. L'observation se fait ainsi dans l'eau, où la coloration ne persiste pas indéfiniment, mais subsiste un temps largement suffisant à la réalisation des observations nécessaires.

Nous ne prétendons pas que cette méthode donnera toujours des renseignements précis sur la structure des noyaux ; nous avons certes observé, à maintes reprises, des aspects de prophase ou de métaphase du noyau de fusion des basides tout à fait comparables à ceux que révèlent les colorations classiques de coupes au microtome de matériel fixé ; les chromosomes, par exemple, apparaissent remarquablement individualisés ; mais très souvent les noyaux se trouveront évidemment altérés et réduits à des boules très chromophiles. Aussi bien ne proposons nous pas cette méthode commode à ceux qui désirent étudier la structure fine du noyau mais bien aux chercheurs qui veulent simplement mettre les noyaux en évidence pour les localiser ou les dénombrer par exemple. Dans ce sens, elle nous paraît susceptible de rendre de grands services pour les exercices pratiques de licence, non seulement en Botanique, mais en Zoologie, et nous avons la certitude qu'en Mycologie elle pourrait fournir une moisson considérable de documents en un temps record.

Nous avons obtenu de très jolis résultats avec l'hyménium de *Collybia velutipes*, *Panus stipticus*, *Schizophyllum commune*, *Cyphella ampla*, etc... La méthode montre avec une netteté parfaite que chez le *Panus*, la spore est uninucléée, des noyaux résiduels fortement colorables restant dans la baside, alors que chez *Schizophyllum* et *Cyphella ampla* la spore est généralement binucléée à maturité, les vieilles basides étant le plus souvent dépourvues de noyaux résiduels.

Sur des coupes faites à la main dans les gros sclérotés noirs que forme sur carotte ou HAGEM gélosé le *Nolanea mammosa* (= *hirtipes* de plusieurs Auteurs) nous avons reconnu que les articles internes sont souvent binucléés, mais qu'ils peuvent aussi renfermer trois, quatre ou cinq noyaux, ou même un très grand nombre.

Le matériel sec des herbiers peut également donner des résultats, au moins s'il n'est pas trop vieux ; sur un exemplaire de *Nolanea mammosa* desséché depuis deux mois, nous avons pu colorer de façon très frappante, non seulement les deux noyaux de la spore, mais encore les noyaux des articles hyméniens ; il était très facile notamment de reconnaître la présence de deux noyaux dans la baside très jeune.

Si peu étendue que soit encore notre expérience en la matière, nous avons déjà enregistré quelques échecs. Il nous a été impossible de mettre en évidence les noyaux de diverses hyphes du carpophore de *Schizophyllum*, alors que ceux des spores et des basides du même carpophore se teignaient de façon brillante. Nous n'avons pas réussi non plus à colorer les noyaux du sous-hyménium et des basides de *Coprinus radiatus*, notamment le gros noyau de fusion, alors que les chromosomes se coloraient intensément et électivement lors de la division ultérieure de ce noyau.

Chez *Coprinus radiatus*, une hydrolyse de 5 minutes fait apparaître dans les basides et dans certains autres articles du carpophore des boules que le GIEMSA colore en bleu intense ; elles disparaissent après une hydrolyse de 15 minutes. Nous avons retrouvé de petites boules colorables en bleu-noir dans certaines hyphes du carpophore de *Schizophyllum* après une hydrolyse de 10 minutes. On ne risque pas de confondre des formations de ce genre avec les noyaux, car la couleur que le réactif de GIEMSA communique à ceux-ci est très différente. Là où

les noyaux des Basidiomycètes se colorent électivement avant hydrolyse, ils prennent une teinte rouge cerise plus ou moins marquée. Après un temps convenable d'hydrolyse leur couleur fonce beaucoup et ils peuvent devenir pourpre-foncé ou même pourpre-noir, mais quelle que soit l'intensité de la coloration qu'ils prennent, celle-ci ne tire jamais sur le bleu mais plutôt sur le rouge.

Les noyaux ne sont pas forcément les seules parties de l'article qui se colorent au GIEMSA après hydrolyse. La paroi peut se colorer fortement, par exemple en rouge vif, comme cela se voit dans les hyphes du voile général de *Coprinus radiatus*, qui se comportent d'ailleurs de façon identique avant hydrolyse. Même lorsque la coloration prise par la membrane est intense, les noyaux restent généralement très visibles, apparaissant encore plus foncés, parfois presque noirs, pour un temps convenable d'hydrolyse. Les callosités qu'on observe çà et là sur les parois transversales des hyphes se colorent aussi en rouge-vif plus ou moins foncé; on prendra garde de les confondre avec les noyaux, dont la teinte peut être identique. On les voit très bien dans certaines hyphes du mycelium de *Coprinus radiatus* et de *Galera mycenopsis*; chez cette dernière espèce, on peut même reconnaître nettement que la callosité comprend deux plaques ou hémisphères se teignant en rouge, séparés par une fine lamelle incolore, représentant la cloison initiale, de part et d'autre de laquelle la matière colorable s'est déposée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) KÜHNER R. — Remarques d'ordre technique sur l'étude de la répartition des noyaux dans les myceliums de Basidiomycètes (*Bull. Soc. Linn. Lyon*, 14^{me} année, 1945, p. 177).
- (2) — — Le genre *Mycena* (Tome VIII de l'*Encyclopédie Mycologique* de P. LECHEVALIER, Paris, 1938).
- (3) — — Utilisation du carmin acétique dans la classification des Agarics leucosporés (*Bull. Soc. Linn. Lyon*, 7^{me} année, 1938, p. 204).
- (4) — — Observations sur *Coprinus hexagonosporus* en culture pure (*Revue de Mycologie*, XIII, p. 92, 1948).
- (5) ROBINOW C. F. in DUBOS R. J. — The Bacterial Cell (*Harvard University Press*, 1947).

NOTULES D'HERBORISATION

Gagea Liottardi Schult. — Trouvé à la Grande-Chartreuse, prairie du Charmant-Som (DENNINGER).

Notochloena Marantae R. Br. — Toujours présent à la station classique, route de Tournon à Lamastre, près de l'embranchement conduisant à la station de Colombier-le-Vieux (DENNINGER).

Ophioglossum vulgatum L. — Existe en plusieurs stations aux étangs de Lavaure (DENNINGER).

Sempervivum arachnoideum L. — Acclimatation prospère de cette espèce et de quelques autres formes sur l'aqueduc romain de Soucieu entre « le Coq Gaulois » et le Réservoir (LAPP).

Trifolium angustifolium L. — Plante plutôt méridionale qui existe au fort de Montessuy, probablement introduite (MANNERS).

Bifora radians Bab. — Trouvé à la Croix-Rousse. Accidentelle (MANNERS).

Bifora testiculata DC. — Trouvé à Caluire. Accidentelle (QUENEY).

Hydrocharis Morsus-ranae L. — Reyrieux, îlons de la Saône (BANGE).

Alisma parnassifolium L. — Marécages des environs de Bourgoin (QUENEY).

Nous recommandons instamment à MM. les botanistes de veiller à la conservation des stations de plantes rares.