

SUR UNE NOUVELLE ESPECE DE *SACCHAROMYCES*,
S. ANNULATUS n. sp.

Par P. NEGRONI

La levure en question, qui avait été envoyée au laboratoire du D^r Sabouraud par le D^r Strominger, de Bucarest, provient d'un abcès épидидymaire supposé de nature mycosique. Malheureusement, nous ne possédons pas les données cliniques détaillées de la maladie.

Les préparations directes et les cultures ont démontré la présence de levures ovales ou allongées, à forme ovale prédominante. Les premières cultures sur milieux solides ont permis de constater la production d'asques contenant de une à quatre ascospores rondes, lisses et pourvues d'un anneau équatorial saillant.

L'étude approfondie des caractères cultureux et des propriétés biologiques que nous allons exposer, nous a démontré qu'il s'agissait d'une espèce nouvelle du genre *Saccharomyces* ; cette espèce est la seule connue jusqu'à présent qui produise des spores entourées au milieu d'un anneau saillant.

Caractères morphologiques et développement. — Examinée au bout de vingt-quatre heures, la culture sur carotte présente des cellules ovales ou allongées, dont les dimensions oscillent entre $4 \mu \times 3 \mu$ de diamètre pour les plus petites et $11 \mu, 5 \times 6 \mu, 5$ pour les plus grandes. Les cellules végétatives bourgeonnent à l'une des extrémités.

Sur *moût de bière gélifié*, le développement est confluent, blanc sale, de consistance crémeuse et à surface brillante et humide. Il y a fermentation du liquide de condensation. La colonie géante sur le même milieu mesure environ 4 cm. de diamètre au bout d'un mois (19, fig. 3). Les bords présentent de grands festons dont les échancrures correspondent à des sillons radiés à la surface de la colonie. Celle-ci est grisâtre, à surface brillante et humide avec quelques petites élévations cratériformes dans la partie centrale. Sa consistance est crémeuse.

Le *moût de bière liquide* devient trouble et fermente et il y a formation d'un dépôt au fond du tube. Au bout de quelques jours, le milieu se clarifie et on voit apparaître un anneau à la surface. Le dépôt persiste toujours.

Dans la *gélatine*ensemencée par piqûre, la levure se développe en tête de clou, c'est-à-dire à la surface du milieu et le long de la piqûre où elle se présente sous forme de mamelons juxtaposés. La gélatine n'est pas liquéfiée au bout de deux mois et demi.

Sur *carotte*, la culture présente les mêmes caractères généraux. Le développement est grisâtre, brillant, humide. Sur ce milieu, la levure sporule assez facilement. Parfois, sur certaines carottes, les cellules se chargent de graisse et ne sporulent pas.

Sur *milieu de Gorodkova*, au bout de quelques jours, à 30° C., presque toutes les cellules sont transformées en asques, sans copu-

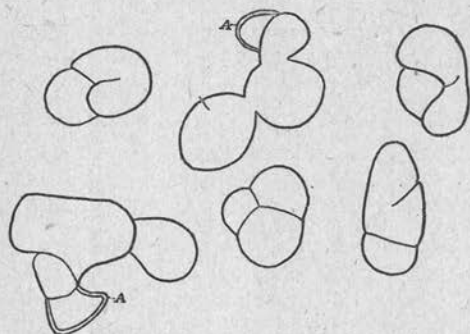


FIG. 1. — Germination des ascospores au bout de 21 h. à 30° A, membrane de l'asque à double contour accolée aux gamètes.

lation préalable. Les asques contiennent de 1 à 4 ascospores ; plus fréquemment, 2. Les spores sont rondes, lisses, aplaties aux pôles et mesurent environ 3μ 5 de diamètre. Elles présentent un anneau équatorial saillant, bien visible et coloré en noir dans les préparations faites à l'hématoxyline ferrique (18, fig. 3). Elles ont donc une forme semblable à celles de *Willia saturnus* ; toutefois, leur anneau saillant est moins apparent que dans cette dernière levure.

Sur *bloc de plâtre*, on obtient facilement la production des spores qui offrent les mêmes caractères que sur le milieu de Gorodkova.

Germination des ascospores. — En tuant les cellules végétatives à l'étuve à 55° pendant 12 à 24 h. et en faisant germer les ascospores soit sur milieux solides, soit en gouttes pendantes, on constate que ces spores copulent deux à deux (8 à 15, fig. 3) à l'intérieur de l'asque avant de germer (fig. 1). Dans le cas où l'asque ne renferme qu'une seule spore, celle-ci germe isolément. Dans le cas où il y a 3 spores, une des spores ne germe pas. Je n'ai jamais constaté la copulation de celle-ci avec une autre spore d'un asque voisin. On voit aussi des figures de parthénogénèse (A, fig. 2), où l'une des

spores germe sans copuler avec sa voisine. Le bourgeon apparaît le plus souvent au milieu du canal de copulation, parfois sur l'un des gamètes. Ce type de sexualité correspond à celui que l'on constate dans diverses levures, entre autres dans le *Saccharomyces ludwigii*.

Pouvoir fermentatif. — Presque tous les sucres employés dans la méthode des petites fermentations de Lindner ont fermenté. Au bout de 24 h., à 30° C., le glycose, le maltose, le lactose, le galactose, le raffinose fermentent; le saccharose et le xylose fermentent faiblement. Il n'y a pas inversion du saccharose.

Température optima, maxima et minima de bourgeonnement. — Il n'y a pas de bourgeonnement à des températures oscillant entre + 3° et + 7° C. La levure se développe à la température du labora-

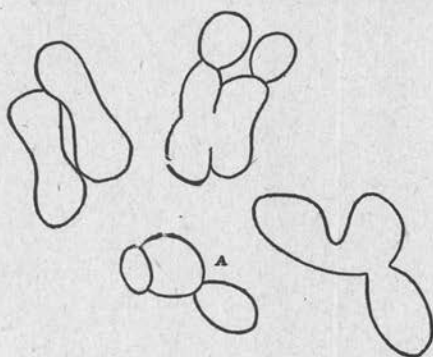


FIG. 2. — Germination des ascospores au bout de 48 h. à 30°. A, germination parthénogénétique.

toire qui oscille entre 14° et 17° C. Le développement est assez bon à l'étuve à 28°, mais la température optima de bourgeonnement est au voisinage de 40° C. La température maxima de bourgeonnement est de 43° C.

Les spores apparaissent au bout du troisième jour à la température du laboratoire (14°-17° C.). La température optima de sporulation est de 28° C. A cette température, les spores commencent à se former au second jour. Il n'y a pas formation de spores à l'étuve à 40° C.

Etude cytologique. — Sur le frais, les cellules végétatives d'une culture de 24 h., sont ovales ou allongées, à simple contour et contiennent une grosse vacuole centrale (parfois deux, l'une grande et l'autre petite) ou une vacuole à chaque extrémité dans les cellules allongées.

Les vacuoles contiennent parfois des corpuscules animés de mouvements browniens et elles sont entourées d'une couronne de granulations graisseuses, très réfringentes et osmioréductrices.

A l'examen au fond noir, les cellules vivantes sont optiquement vides, seules les granulations graisseuses sont visibles grâce à leur réfringence, comme Guilliermond vient de le démontrer tout récemment. Les cellules mortes sont remplies de granulations réfringentes qui résultent de la coagulation du protoplasma.

Etude vitale. — Quand on examine la levure entre lame et lamelle avec une solution faible de rouge neutre ou de bleu de crésyl, on constate que la métachromatine, contenue dans les vacuoles, précipite sous la forme de corpuscules animés de vifs mouvements browniens. Si on continue l'observation sous le microscope, on voit, comme l'a fait remarquer Guilliermond (1) que ces corpuscules augmentent de volume, se fusionnent entre eux et, finalement, s'accolent à la paroi vacuolaire. Ils deviennent alors immobiles et prennent la forme de croissants. Parfois, ces corpuscules, colorés en rouge pourpre par le rouge neutre, forment hernie sur la paroi vacuolaire ou sortent même de la vacuole. Ils continuent à se fusionner, les croissants s'allongent et s'amincissent. Assez souvent, il en reste un seul entourant la vacuole presque entièrement. A ce moment, la métachromatine commence à se dissoudre à nouveau dans le suc vacuolaire et la vacuole reste finalement colorée uniformément en rouge orangé par le rouge neutre ou en bleu violacé clair, par le bleu de crésyl (1, 2, 3, 4, 5, fig. 3).

La coloration vitale du chondriome est très difficile à obtenir, parce que la pénétration du colorant se fait mal. On doit employer à cet effet, une solution très faible de vert Janus ou de violet dahlia et prolonger le contact avec la levure pendant une demi-heure.

Le bleu d'indophénol permet de colorer vitalement les graisses en bleu clair. On peut aussi colorer simultanément les vacuoles par le rouge neutre et les graisses par le bleu d'indophénol.

La solution faible de Lugol colore en brun acajou le glycogène, qui apparaît soit aux deux extrémités de la vacuole, quand la cellule est allongée et la vacuole centrale, soit à l'un des pôles quand la vacuole est excentrique (6, 7, fig. 3).

Etude cytologique après fixation. — Si on fixe les cellules à l'alcool absolu ou au formol à 40 p. 100 pendant une demi-heure et qu'on colore après pendant quelques secondes par une solution

(1) GUILLIERMOND (A.). — Nouvelles observations sur la coloration vitale par le rouge neutre dans les cellules végétales. *C. R. Acad. Sc.*, CLXXXVIII, 1929, p. 813.

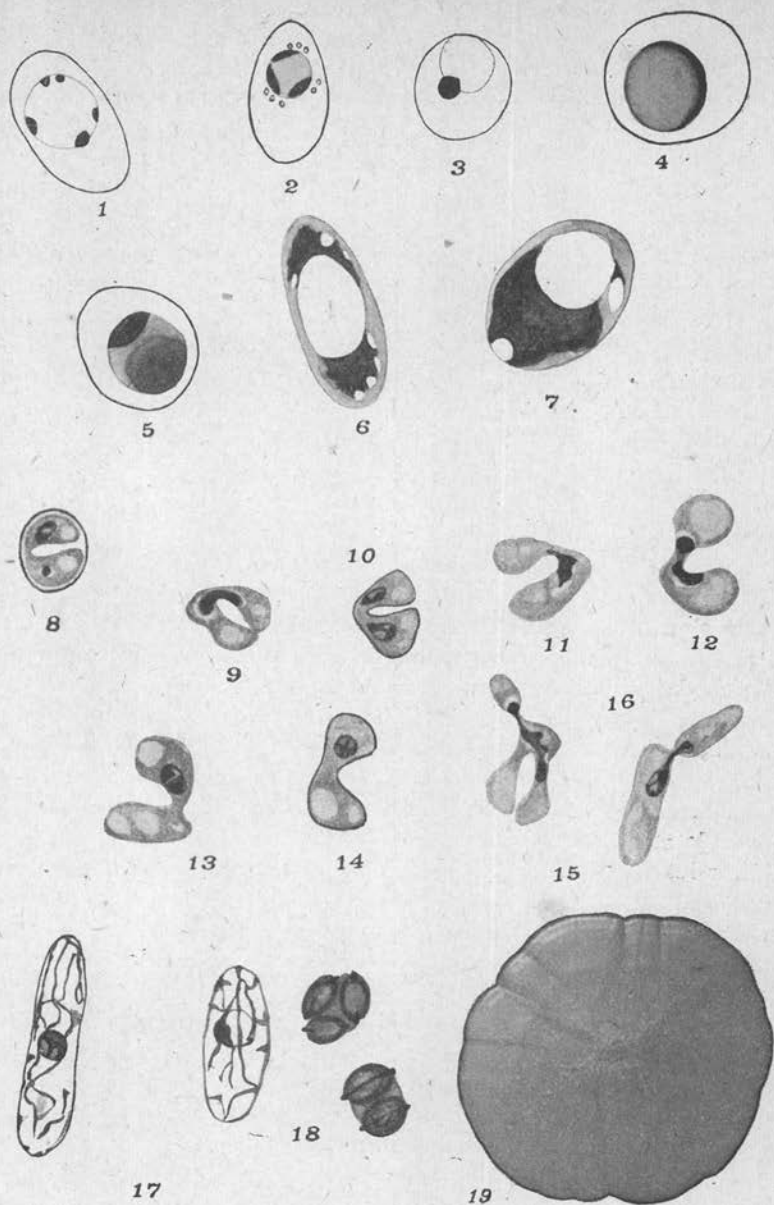


FIG. 3. — 1, 2, 3, 4, 5, divers états de la métachromatine précipitée par le rouge neutre ; 6, 7, le glycogène coloré par la solution faible de Lugol ; 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, diverses phases de la copulation des ascospores, préparations colorées par l'hématoxyline ferrique ; 15, copulation et germination des ascospores ; 16, division directe du noyau dans le bourgeonnement de la levure ; 17, chondriome ; 18, ascospores avec leurs anneaux saillants colorés par l'hématoxyline ferrique ; 19, colonie d'un mois sur milieu glycosé de Sabouraud.

à 1 p. 100 de bleu de méthylène, on voit à l'intérieur des vacuoles la métachromatine colorée en rouge foncé et le protoplasma en bleu clair. La métachromatine se dispose en granulations dans la ligne de séparation des spores quand celles-ci n'ont pas achevé leur développement complet.

On peut colorer en même temps la métachromatine et les noyaux par l'hémalum après fixation à l'alcool ou au formol. La métachromatine prend alors une couleur rouge très foncé, presque noir, les noyaux une teinte bleue un peu plus accentuée que celle du protoplasma.

On peut faire une double coloration de la métachromatine et du glycogène, en traitant ensuite la préparation par le réactif iodo-ioduré.

Les graisses prennent une coloration orange par le soudan III, après fixation au formol et, si on les colore avant ou après coloration par l'hémalum, on obtient la coloration des graisses, de la métachromatine et des noyaux.

La coloration à l'hématoxyline ferrique, après fixation au Bouin ou au Flemming, permet l'étude des noyaux. Le noyau est pourvu d'un nucléole, d'un réseau chromatique et d'une membrane.

Dans les cellules en voie de bourgeonnement, le noyau s'allonge, introduit une de ses extrémités dans le bourgeon déjà formé, s'amincit à l'endroit de la séparation de la cellule-mère et du bourgeon, puis finalement se divise et les noyaux fils émigrent vers le centre de la cellule. La division est donc directe (16, fig. 3).

Dans les préparations de spores en voie de germination colorées à l'hématoxyline, on constate que les noyaux se fusionnent le plus souvent au milieu du canal de copulation, parfois à l'intérieur de l'un des gamètes. Le noyau résultant de cette fusion émet un prolongement à l'intérieur du bourgeon formé à l'endroit où s'opère la fusion nucléaire (8 à 15, fig. 3).

Dans les cellules en voie de sporulation, le protoplasma devient très granuleux (sporoplasma) et se colore fortement par l'hématoxyline empêchant de voir la division du noyau.

Les vacuoles apparaissent comme des espaces clairs au milieu du protoplasma gris bleuâtre.

Les préparations fixées au Meves ou par la méthode de Benda permettent l'étude du chondriome. Celui-ci se présente sous la forme de filaments longs, flexueux, parfois ramifiés. La simple fixation au formol pendant une demi-heure, suivie de la coloration à l'hématoxyline ferrique, nous a permis d'obtenir de très belles préparations du chondriome (17, fig. 3).

Laboratoire du Professeur Guilliermond, Faculté des Sciences de Paris.