NOUVEAU PROCÉDÉ DE CULTURE
SUR LAMES GÉLOSÉES APPLIQUÉ A L'ÉTUDE
MICROSCOPIQUE DES CHAMPIGNONS DES TEIGNES

Par E. RIVALIER et S. SEYDEL

On sait que l'étude microscopique des champignons des teignes, comme celle de tous les champignons filamenteux, n'est pas sans offrir quelques difficultés.

L'examen des fragments de cultures dilacérés a l'avantage de la facilité et de la rapidité, mais si ce procédé permet de reconnaître les principaux organes de fructification, il ne respecte pas leurs rapports avec le mycélium et ne fait pas connaître la véritable architecture de la plante.

On peut faire le même reproche au procédé du décalque (Klatsch) qui nécessite la culture en boîtes de Petri et fournit des préparations parfois élégantes, mais ne peut donner du champignon qu'une représentation incomplète. La meilleure méthode était, jusqu'à maintenant, celle des cultures en gouttes pendantes, imaginée en 1873 par Van Tieghem et Le Monnier et devenue classique en mycologie. Ce procédé est bien connu et n'a rien perdu de sa valeur. Il est irremplaçable quand on veut suivre au microscope la germination des spores et les premiers stades du développement. Mais il est laborieux et souvent décevant quand on se propose d'obtenir des cultures destinées à être fixées et conservées. De l'aveu même de Sabouraud, qui appliqua la méthode aux champignons des teignes, il est nécessaire de préparer une quarantaine de cellules ensemencées avec un même champignon pour obtenir une ou deux cultures parfaitement bien développées. La dessiccation du milieu ou au contraire l'aération insuffisante des cellules semblent être les principales causes d'échec. D'ailleurs, même quand la culture est bien venue, elle est limitée dans son développement par l'étendue de la goutte nutritive et ne peut dépasser de petites dimensions.

Il ne semble pas que les autres procédés préconisés par divers mycologues aient apporté de sérieux perfectionnements. La méthode des « lames sèches », imaginée par Unna, consiste à faire développer un mycélium de champignon sur une lame de verre sèche, dont

le tiers inférieur plonge dans le milieu nutritif (liquide ou solide) contenu dans un tube de Borrel et à pratiquer l'ensemencement à la jonction du milieu et de la lame de verre. Ce procédé a donné de bons résultats entre les mains de de Beurmann et Gougerot pour l'étude de la sporotrichose, mais il nous semble médiocre pour celle des champignons des teignes : presque toujours, en effet, on observe un développement luxuriant sur le milieu contenu dans le tube, tandis qu'il ne grimpe sur la lame que des filaments végétatifs à peu près démunis de tout organe de fructification.

Le procédé de Meyer est une variante du procédé des cellules, mais avec chambre humide beaucoup plus vaste : les lamelles destinées à l'ensemencement sont placées dans un petit cristalliseur ouvert, contenu lui-même dans un cristalliseur fermé avec de l'eau stérile dans l'espace annulaire ; chaque lamelle reçoit une goutte du milieu nutritif dans laquelle on sème le champignon. Cette méthode, assez compliquée et encombrante, ne nous semble pas remédier à tous les inconvénients des cellules. Il en est de même de la méthode du bloc suspendu (*hanging block*), très employée par les mycologues nord-américains et décrite par Miss Dalmau.

Le procédé que nous présentons, et auquel nous nous sommes arrêtés après divers tâtonnements, est apparenté aux précédents, dont il diffère par de nombreux détails. Il repose sur l'emploi de lames revêtues d'une couche *mince et uniforme* de gélose nutritive et maintenues dans une chambre humide. Les cultures ainsi obtenues, se décollant facilement, nécessitaient une technique particulière de fixation. Nous l'avons trouvée dans le collodionnage emprunté à certains procédés histologiques bien connus depuis les travaux de Regaud.

En raison de la perfection et de la régularité des résultats obtenus, nous nous croyons autorisés à exposer la méthode dans ses détails.

I. TECHNIQUE DE CULTURE.

Les lames destinées aux cultures doivent être neuves, parfaitement propres, *flambées* au bec Bunsen et *complètement refroidies* avant l'emploi. On préparera donc à l'avance de cette manière un certain nombre de lames qui seront placées dans un récipient stérile et clos (tube de Borrel ou petit cristalliseur).

On disposera, d'autre part, d'une série de boîtes de Petri (1) stéri-

(1) On peut employer des cylindres Borrel, munis d'un prisme de verre et renfermant chacun trois lames. Mais la disposition horizontale, en boîtes de Petri, est préférable.

les, renfermant chacune une baguette de verre courbée en U et destinée à servir de support aux lames. On choisira des boîtes de Petri de 12 cm. de diamètre pouvant contenir deux lames juxtaposées ; des boîtes plus grandes, favorisant les contaminations, sont défavorables ; nous employons de préférence des boîtes carrées, moins encombrantes, mais ce modèle n'est pas indispensable.

Le milieu de culture est une gélose de consistance faible, mais qui pourra varier dans sa composition selon les résultats qu'on désire obtenir ; nous y reviendrons plus loin, mais nous pouvons donner comme type de milieu convenable la gélose d'épreuve de Sabouraud préparée avec 6 gr. d'agar par litre au lieu de 18. Le milieu remplira aux $4/5$ un tube de Borrel et sera maintenu en fusion au bain-marie à 60°. Pour recouvrir les lames, il suffit de saisir celles-ci une à une avec une pince flambée, de les plonger un instant dans la gélose liquide et de les déposer dans les boîtes de Petri sur les supports en verre préparés à cet effet ; la face supérieure de la lame est ainsi enduite d'une couche uniforme aussitôt solidifiée ; peu importe qu'une goutte épaisse demeure pendante à la face inférieure qui ne sera pas utilisée. L'étalement de la gélose ne se fait correctement que sur une lame parfaitement propre, flambée et froide ; sur une lame non flambée la gélose n'adhère pas ; une lame plongée trop chaude dans le milieu se couvre de bulles d'air ; de là l'importance des précautions indiquées plus haut.

Quand le nombre de boîtes nécessaires est préparé, on introduit à la pipette 5 ou 6 centimètres cubes d'eau stérile dans le fond de chaque boîte, et l'on ensemence, en déposant au milieu de chaque lame une parcelle aussi petite que possible, mais cependant visible, du champignon à étudier, et qui devra être prélevée — ce détail est important — sur une culture jeune, floride, en plein développement.

L'humidité constante de l'atmosphère de la boîte, assurée par l'eau déposée au fond, s'oppose à la dessiccation de la mince couche nutritive, et l'on voit le champignon se développer avec la même rapidité que dans un tube de culture ; l'abondance de la végétation est naturellement en rapport avec l'épaisseur de la couche de gélose et la valeur nutritive de celle-ci. Les espèces vigoureuses (*Microsporium* animaux, *Trichophyton* microïdes) atteignent leur plein épanouissement en une dizaine de jours et recouvrent la lame dans toute sa largeur (fig. 1) ; d'autres espèces ont une croissance plus lente ; pour ces dernières, il faut avoir soin d'éviter la dessiccation et de renouveler, le cas échéant, la réserve d'eau dans le fond de la boîte.

Le principal écueil de ce mode de culture est la souillure par les poussières atmosphériques au cours des manipulations. On la réduit beaucoup en opérant dans un local sans courants d'air, aussi isolé que possible, protégé contre les allées et venues et les nettoyages intempestifs au balai et au plumeau. Ces précautions sont élémentaires ; malgré elles on n'évitera pas toujours la souillure de quelques boîtes par des moisissures, mais ce déchet, dans de

FIG. 1. — Aspect d'une culture de huit jours de *Trichophyton laticolor* sur lame gélosée.

bonnes conditions de travail, ne dépasse pas 5 p. 100, et il est hors de proportion avec le pourcentage d'insuccès des cultures en cellules.

II. TRAITEMENT DES PRÉPARATIONS, FIXATION ET COLORATION.

A. Dessiccation. — Quand la culture est parvenue au développement désiré, les lames sont retirées et aussitôt nettoyées de toute la gélose inutile qui recouvre la face inférieure ; à la face supérieure on délimite, en se servant d'une lame sèche tenue comme pour un étalement de sang, le carré de gélose qui supporte la culture, et on enlève avec soin tout le reste. La préparation est alors abandonnée pendant 24 heures à l'étuve à 37°, face en-dessous, sur un support métallique, ce qui assure une dessiccation complète sans dépôt de poussière. Au bout de ce temps, on aura soin de détacher, avec une aiguille emmanchée ou avec la pointe d'un scalpel, le bouton central de la culture, voire même toute la zone centrale si elle est saillante et susceptible de gêner les manipulations ultérieures, et on pourra dès lors procéder au collodionnage et à la coloration.

B. Collodionnage. — Le premier temps consiste à immerger un instant la lame dans un flacon contenant du collodion dilué (à raison de 1 partie de collodion officinal (1) pour 4 parties d'un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther) ; puis la lame est égouttée rapidement et mise à sécher à l'air libre horizontalement et face en-dessus, sur un support. Cette opération remplit le double but de fixer le champignon et de le coller solidement sur la lame en même temps que la plaquette de gélose qui le supporte. Elle modifie aussi peu que possible l'architecture de la plante dont tous les organes demeurent en place, à cette réserve près que les rameaux dressés sont rabattus dans un plan horizontal comme des feuilles dans un herbier.

La technique originale du collodionnage de Regaud comporte la précipitation du collodion par l'alcool à 70° ; cette manœuvre s'est montrée nettement défavorable pour les préparations de champignons et nous lui avons substitué la simple dessiccation à l'air libre. Il est nécessaire que celle-ci soit parfaite ; bien qu'elle soit en apparence réalisée en une dizaine de minutes et annoncée par l'aspect irisé de la préparation, il est bon de la prolonger plusieurs heures. Nous avons obtenu les meilleurs résultats en abandonnant les lames collodionnées à la température du laboratoire (on les retourne alors face en-dessous pour éviter le dépôt des poussières), et en remettant la coloration au lendemain.

Une fois collodionnées et sèches, les lames peuvent d'ailleurs être manipulées sans précautions particulières ; la mince lame cellulosique assure une protection complète tout en offrant la perméabilité nécessaire à la coloration.

C. Coloration et montage. — La plupart des procédés de coloration bactériologiques et histologiques peuvent être, en principe, appliqués aux cultures ainsi collodionnées. Cependant, il faut signaler qu'il se forme parfois, avec certaines teintures en simple solution aqueuse, des poches de liquide coloré, dues probablement à l'imbibition de la couche gélosée.

Cet incident ne se produit jamais avec le bleu coton au lactophénol, que nous employons, de préférence, pour le travail courant.

Voici la formule de ce colorant, dû à Langeron :

(1) Rappelons la formule du collodion officinal :

Cellulose octonitrique	5 gr.
Alcool éthylique à 95°	20 gr.
Ether rectifié du commerce	75 gr.

Bleu coton C'B de Poirrier	1 gr.
Lactophénol de Amann (1)	100 cm ³

La marche à suivre est la suivante :

1° Faire agir le colorant sur la préparation pendant 10 à 15 minutes.

2° Laver à l'alcool à 70°. On peut se débarrasser de l'excès de colorant par un lavage préalable à l'eau, mais celui-ci doit être très rapide, afin d'éviter les phénomènes d'imbibition de la gélose déjà signalés.

3° Deshydrater pendant quelques instants dans l'alcool à 90°-95°.

4° Achever la déshydratation dans l'acétone anhydre, qui différencie, en outre, remarquablement la coloration. L'emploi de l'alcool absolu, qui dissout le collodion, doit être, autant que possible, évité.

5° Acétone anhydre et xylol ou toluène à parties égales ; ce mélange doit être parfaitement limpide.

6° Xylol ou toluène ; la préparation doit y devenir transparente, sans aucun louche.

7° Monter au Baume du Canada ou à la résine Dammar.

S'il se produit la moindre opalescence blanchâtre, au moment du passage dans le xylol ou le toluène, il faut revenir en arrière, car c'est un indice de déshydratation insuffisante ; celle-ci doit être alors achevée dans de l'acétone réellement anhydre. Il est à peine besoin de dire que cet acétone doit être conservé, comme l'alcool absolu, dans des flacons ou des tubes de Borrel hermétiquement fermés, et que son titre baisse progressivement, quand on déshydrate un certain nombre de préparations dans le même liquide.

Ajoutons, enfin, qu'il est facile d'adapter la technique précédente à telle coloration particulière que l'on voudra employer.

III. INTÉRÊT DE LA MÉTHODE.

L'ensemble des manipulations décrites ne comporte aucune difficulté particulière ; il n'exige qu'un matériel courant et le résultat en est automatique, si l'on tient compte des divers détails techni-

(1) Acide phénique crist. chimiquement pur	1 gr.
Acide lactique	1 —
Glycérine	2 —
Eau distillée	1 —

ques qui ont tous leur importance. L'aspect microscopique est parfait pour peu que la culture soit d'épaisseur convenable ; le développement du champignon est suffisamment étendu pour qu'on puisse étudier ses organes de fructification et prendre connaissance de leur répartition dans les diverses zones concentriques et de leur mode de formation dont les stades s'échelonnent de la périphérie vers le centre.

On peut d'ailleurs modifier les caractères de la culture en faisant

FIG. 2. — Grappe sporifère du *Trichophyton laeticolor* dans sa forme la plus simple, $\times 200$.

varier, soit l'épaisseur du milieu qui est fonction de sa teneur en gélose et de la température au moment de l'application, soit les qualités nutritives de ce même milieu. Floride sur une couche épaisse et riche, la culture est de plus en plus grêle à mesure que la lame de gélose est plus mince et plus pauvre. L'image microscopique gagne en netteté dans ce dernier cas, mais ce peut être au détriment de certains caractères essentiels : c'est ainsi qu'on peut voir en pareilles circonstances disparaître les vrilles des *Trichophyton* microïdes. Il faut donc trouver des conditions optima qui ne sont pas nécessairement les mêmes pour toutes les espèces ni

pour tous les détails que l'on veut étudier, mais ne pas craindre un développement assez riche. Les microphotographies ci-jointes (fig. 2 et 3) montrent qu'une préparation relativement épaisse, à plusieurs plans superposés, ne s'oppose pas à l'obtention d'un document photographique précis.

La méthode proposée permet de multiplier à volonté les ensemencements sur un milieu type et de se rendre compte si aux aspects cultureux des différentes espèces correspondent des carac-

FIG. 3. — Organes en fuseaux du *Microsporium fulvum*.
Culture sur lame gélosée, $\times 200$.

tères microscopiques constants et précis. Elle s'adapte d'autre part à toutes les variations possibles des milieux gélosés (milieux sans sucre, milieux aux polysaccharides de Langeron, etc.) qu'une recherche particulière peut conduire à expérimenter.

Il est certain, d'ailleurs, que ses applications dépassent l'étude des parasites des teignes et s'étendent à tous les champignons pourvus de mycélium ou d'organes de fructification fragiles. Nous pensons donc apporter aux recherches mycologiques un élément de commodité qui justifie le précédent exposé.

BIBLIOGRAPHIE

- DALMAU (L.-M.). — Remarques sur la technique mycologique. *Ann. de paras.*, VII, 1929, p. 537-538.
- GUEGUEN (F.). — *Bull. Soc. mycol. de France*, XXI, 1905, p. 42-46 (Emploi du bleu C⁴B de Poirrier).
- LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*, 4^e édition, Paris, Masson, 1925 (Collection des Précis médicaux).
- REGAUD. — *Arch. d'anat. microsc.*, IV, 1901.
- RIVALIER (E.) et SEYDEL (S.). — Cultures sur lames gélosées, colorées et examinées *in situ* en préparations définitives, pour l'étude des cryptogames microscopiques. *C. R. Soc. biol.*, CX, 1932, p. 181-184.
- SABOURAUD (R.). — *Les teignes*. Paris, Masson, 1910.
- UNNA. — Die Züchtung der Oberhautpilze. *Monatshefte für prakt. Dermat.*, VII, 1888, p. 465.
- Zur Untersuchungstechnik der Hyphomyceten. *Centralbl. für Bakt.*, XI, 1892, p. 4-9, 40-44.
- VAN TIEGHEM et LE MONNIER. — *Ann. des sc. nat. (bot.)*, (5), XVII, 1873, p. 261-399, pl. XX-XXV.
- WOLBACH, SISSON et MEIER. — *Journ. of med. res.*, XXXVI, 1917, p. 348.

Laboratoire de la Ville de Paris à l'Hôpital Saint-Louis.