REVUE CRITIQUE

EMPLOI DES COLORANTS ACIDES EN MYCOLOGIE ET EN MICROBIOLOGIE GÉNÉRALES COLORATION DES ASCOSPORES DES LEVURES

Par M. LANGERON et Ph.-J. LUTERAAN

La tradition, et aussi la routine, exigent que les microorganismes, pour être étudiés, soient colorés à l'aide de colorants basiques. Cette tradition se trouve fixée et, en quelque sorte, justifiée par l'existence de deux méthodes fondamentales que rien n'est arrivé à remplacer jusqu'ici : la méthode de Gram au violet cristal et celle de Ziehl-Neelsen à la fuchsine basique.

Ces deux méthodes resteront donc en dehors de l'exposé critique que nous allons faire. Signalons seulement que, dans les pays anglosaxons, il y a tendance à abandonner, pour la méthode de Gram, les violets phéniqué et aniliné et à les remplacer par le *violet à l'oxalate d'ammonium*, suivant la formule donnée par G. J. Hucker (1922). On obtient ainsi un colorant beaucoup plus stable et aussi efficace, l'acide oxalique et ses sels étant de très bons adjuvants des teintures. L'un de nous a reconnu expérimentalement que l'acide oxalique à 1 p. 100 donne une grande stabilité aux solutions de colorants basiques.

Encore faut-il que ces deux méthodes soient employées judicieusement. Par exemple, on voit encore colorer les levures par la méthode de Gram et chercher, sans rire, si ces organismes prennent ou non le Gram. Il y a même des travaux d'ensemble sur la réaction de Gram qui ont été entrepris en utilisant les levures comme matériel d'étude. Pour en arriver là, il faut ignorer complètement que les levures ne peuvent donner cette réaction, parce qu'elles sont bien trop volumineuses, trop épaisses et de structure trop compliquée pour s'y prêter. La nature même de leur paroi s'y oppose et

ANN. DE PARASITOLOGIE, T. XXII, N° 3-4, 1947, p. 254-275.

les résultats ainsi obtenus sont entachés de nullité. Il y a heureusement d'autres moyens d'étudier les levures.

De même, l'emploi de la fuchsine basique phéniquée pour la coloration des ascospores des levures (méthodes de Moeller et de Kufferrath) donne des résultats inconstants, comme nous le verrons plus loin, de sorte que ce procédé perd son caractère de sûreté et de généralité. En outre, il n'est pas *applicable aux cultures sur lames*, parce que la gélose se colore.

L'emploi des colorants basiques est tellement enraciné en microbiologie, qu'on les utilise même très souvent comme colorants de fond ou colorants généraux. Par exemple, on se sert volontiers, comme colorant de contraste après le violet cristal, de Ziehl dilué, liquide très altérable et dont le rouge vineux ne se distingue pas nettement du violet.

Un colorant basique intéressant et qui présente de réels avantages, tout en étant très stable, est le *bleu de toluidine* ; c'est justement celui-là qui n'est pas employé, sauf par de hardis précurseurs comme Sabrazès ou Mann.

Quant à conseiller, comme l'un de nous le fait depuis longtemps, les colorants neutres du type Giemsa, c'est se rendre coupable d'une véritable hérésie. Pourtant, ces mélanges colorent admirablement tous les microorganismes, en révélant les détails de leur structure.

Un autre colorant basique encore plus négligé est l'*azur II* (mélange de chlorhydrates d'azur et de bleu de méthylène) qu'on emploie en solution aqueuse à 1 p. 100, phéniquée à 0,5 p. 100, et qui donne des résultats égaux à ceux du bleu de Kühne.

Il existe encore un colorant basique qui mérite une mention spéciale : c'est la *safranine*. Cette azine à trois noyaux benzéniques et quatre atomes d'azote présente, sur les rosanilines, l'avantage de donner une coloration transparente et comme laquée, qui ne masque pas les détails. Par suite, elle a même été employée comme colorant de fond, pour contraster avec les violets et les bleus, mais alors on l'utilise sans mordant. C'est un colorant aussi puissant que les rosanilines, à cause de son chromophore azinique, renforcé par des auxochromes amines qui lui donnent un caractère fortement basique.

Ce n'est d'ailleurs pas seulement un colorant nucléaire délicat, c'est en outre un colorant électif pour divers éléments dits *safraniphiles* : massues de l'*Actinomyces israeli* et de l'*Actinobacillus lignieresii*, épines de la cuticule des trématodes, différenciation de l'os et du cartilage par la méthode de Schaffer, bois, liège et cutine chez les végétaux, etc, etc... Un très bon procédé pour l'utilisation de

la safranine en histologie générale est la méthode de Curtis à la *safranine picro-bleu*, qui met admirablement en évidence le collagène (en bleu) et les éléments safraninophiles (en rouge). Nous employons pour cela la safranine anilinée de Babès-Duboscq.

Il existe, en histologie normale et pathologique, des méthodes générales de coloration qui utilisent exclusivement les colorants acides. Le meilleur exemple qu'on en puisse citer est la célèbre méthode de Mann, en un temps, au bleu de méthyle-éosine, celle que l'un de nous a dénommée *Mann biacide*, pour la distinguer de l'autre méthode de Mann, à l'érythrosine-bleu de toluidine, parfois injustement désignée sous le nom de méthode de Dominici.

Le Mann biacide (1) se suffit à lui-même et met admirablement en évidence tous les éléments des tissus, en faisant ressortir en rouge brillant les corps acidophiles (hématies, granulations éosinophiles des leucocytes, massues de l'*Actinomyces israeli* et de l'*Actinobacillus lignieresii*, ascospores mûres des divers groupes d'ascomycètes, etc...).

Il y a aussi la non moins célèbre *méthode tétracide de Mallory*, en deux temps, à la fuchsine acide et au bleu de méthyle-acide phosphomolybdique-orange G, destinée surtout à la coloration du tissu conjonctif.

Dans les célèbres *trichromiques de Pierre Masson*, en plus de l'hématoxyline, qui se borne à colorer les noyaux, le rôle essentiel est joué par deux colorants acides associés par paires (fuchsine acide et bleu de méthyle, ponceau de xylidine et bleu de méthyle, fuchsine acide et jaune de métanile).

Ces exemples prouvent que, même en histologie générale, on peut parfaitement se passer des colorants basiques.

Il peut et doit en être de même en microbiologie générale (bactériologie, mycologie, protistologie), sauf, bien entendu, en ce qui concerne les recherches de cytologie pure.

Voyons donc d'abord quels sont les colorants acides dont nous pouvons disposer. Leurs noms sont certainement bien connus ; néanmoins, il y a souvent des hésitations à cause d'une synonymie qui sévit aussi bien dans la systématique des colorants que dans celle des êtres vivants. Voici donc leur liste, suivant la classification chimique adoptée par l'un de nous dans son *Précis de microscopie* (7^e édition, 1948).

(1) M. LANGERON. — *Précis de microscopie, passim*. Ce néologisme a des précédents. Par exemple le triacide d'Ehrlich, d'ailleurs complètement démodé, qui, à côté de deux colorants acides (orange G et fuchsine acide), renferme du vert de méthyle fortement basique, et, par suite, est traité de « *very pretty conundrum* » dans le *Microtomist's Vade-mecum* (10^e éd., 1937, p. 168).

LISTE DES PRINCIPAUX COLORANTS ACIDES

1° Nitrés

acide picrique,
aurantia.
jaune naphтол.

2° Azoïques

- a) *oxyazoïques* orange G.
ponceau de xylidine.
jaune métachrome Geigy.
jaune de métanile.
azorubine.
azophloxine 2 G.
noir naphтол.
orseilline BB.
Bordeaux R.
- b) *tétrazoïques* écarlate R.
congo.
congo-corinthe.
rouge trypan.
bleu trypan.
bleu pyrrol.
bleu diamine.
benzo-purpurine.
benzo-azurine.
azurine brillante.
rosaazurine.
delta-purpurine (rouge diamine 3 B).
azoviolet.

3° Phénylméthanés

- a) *rosanilines* vert lumière.
vert solide F.C.F.
fuchsine acide
bleus de méthyle
- b) *phthaléines* éosines.
érythrosines.
phloxines.
rose bengale.
bleu solide acide R.

Ces corps (1) donnent des colorations beaucoup plus solides que celles fournies par les colorants basiques et surtout par les thiazines.

(1) Pour se procurer ces colorants purs, s'adresser : soit aux maisons françaises : Kuhlmann (R.A.L.), Krall (*Microcolor*), soit aux établissements Geigy, de Bâle ou Gurr de Londres.

Remarques sur quelques colorants acides

1. Les *colorants nitrés* ont en général peu d'emploi. L'*acide picrique* présente le grave inconvénient de diffuser et de se substituer peu à peu aux autres colorants, sur lesquels il exerce en même temps une action destructrice.

Les *jaunes*, à quelque catégorie qu'ils appartiennent, sont en général trop pâles. Pour cette teinte, l'orange G donne de bien meilleurs résultats.

2. Parmi les *oxyazoïques*, l'orange G est un excellent colorant, seul ou associé à une phtaléine (érythrosine ou éosine) ou même à un bleu de méthyle avec lequel il donne une coloration de contraste. C'est aussi un différenciateur d'autres colorants acides ou basiques.

L'*orseilline BB* est un très beau colorant rouge, ainsi que le *Bordeaux R*. Comme colorant bleu, le noir naphtol fait très bien dans le procédé de Curtis (safranine-picro-bleu).

3. Les *tétrazoïques* présentent un grand choix de colorants dérivés de la benzidine, les uns bleus, les autres rouges. Parmi les bleus, nous signalerons le *bleu diamine* et le *bleu trypan*, qui s'associent très bien à la safranine dans le Curtis. Parmi les rouges, le *rouge congo*, la *benzo-purpurine* et la *delta-purpurine*.

Les oxyazoïques et les tétrazoïques, surtout les dérivés de la benzidine, sont très employés par les phytopathologistes pour la mise en évidence des filaments mycéliens dans les tissus végétaux. Mangin (1895) est le principal initiateur de l'emploi de ces colorants, qui, avec le bleu coton (sulfoné du triphénylméthane), sont devenus d'un emploi constant.

4. C'est le groupe des *phénylméthanes* qui paraît en effet avoir le plus d'avenir en microbiologie générale, tant pour les rosanilines acides (vert lumière, bleus de méthyle, fuchsine acide) que pour les phtaléines, avec toute la gamme des érythrosines, éosines, phloxines.

Malgré l'énergique défense passive de la routine, l'emploi des colorants acides commence à progresser.

Les *avantages* qu'ils présentent sont les suivants : longue conservation des solutions ; colorations solides et durables dans le baume du Canada ; manipulations propres et faciles, substituées à des méthodes particulièrement malpropres, telles que la préparation au mortier des colorants phéniqués ou les colorations par chauffage direct jusqu'à émission de vapeurs, suivies de différenciation par des acides minéraux forts, pour arriver à éliminer l'excès de colorant et nettoyer la lame. En effet, les colorants basiques (surtout les

rosanilines) produisent une teinture opaque, qui donne aux micro-organismes l'aspect de silhouettes en noir sur fond clair, avec notable exagération de leur épaisseur, et qui masque entièrement la structure interne.

Au contraire, les colorants acides sont faciles à préparer et se conservent très longtemps sans altération ; les colorations ont lieu facilement et rapidement à froid, sans fixation préalable par la chaleur. La surface des lames reste propre, de sorte qu'un lavage rapide suffit pour chasser l'excès de colorant, sans qu'il soit nécessaire d'employer les acides minéraux forts. La coloration obtenue est transparente et ne modifie ni l'aspect, ni le volume des microorganismes.

HISTORIQUE

W. G. Maneval (1941) a publié le premier travail d'ensemble sur l'emploi des colorants acides en microbiologie. En effet, même la dernière édition de l'ouvrage classique de Conn et collaborateurs (*Biological stains*, 1940) ne mentionne que quelques références sur l'emploi des colorants acides ; outre les dérivés de la fluorescéine, il est question du jaune brillant comme colorant de contraste pour les bactéries acido-résistantes, du bleu solide acide R pour les bactéries du sol et du vert lumière et de l'éosine dans le colorant de Wright pour les capsules et les spores.

Le mémoire de Maneval débute par un bref historique, malheureusement incomplet pour les travaux européens, puisqu'il omet de mentionner le rôle de précurseur joué par Mangin en 1895. C'est en effet ce savant français qui a employé le premier, en histologie végétale, pour la recherche des éléments mycéliens dans les tissus, les colorants acides dérivés de la benzidine (orseilline BB, benzoazurine, azurine brillante) ou les colorants sulfonés du triphénylméthane (bleus de méthyle).

C'est seulement en 1918 que Conn colore les bactéries du sol avec du rose bengale à 1 p. 100 phéniqué. En 1921, le même auteur reconnaît la grande affinité du *rose bengale* pour le cytoplasme bactérien : affinité élective, puisque le mucus et les débris cellulaires ne sont pas colorés. Il constate ainsi la supériorité de ce colorant pour mettre en évidence la structure réelle des cellules bactériennes ; aussi propose-t-il son emploi comme colorant général en bactériologie.

Winogradsky, esprit original et indépendant, après avoir eu des déboires, au cours de ses recherches sur les bactéries du sol, avec

les colorants basiques, renonce à leur emploi et publie, en 1924, la formule de son érythrosine à 1 p. 100 phéniquée. Cette fois, il avait eu un succès complet, puisque ces bactéries, ainsi colorées électivement, tranchent sur le fond incolore ou jaunâtre des éléments minéraux ou organiques du sol. Nous avons utilisé ce colorant avec succès pour nos cultures sur lames de champignons levuriformes ou filamenteux.

Peu après, Conn et Holmer (1926) et Conn (1926) essaient l'érythrosine, le rose bengale B et onze autres dérivés du groupe de la fluorescéine. Ils trouvent que les phloxines, l'érythrosine X et le rose bengale sont de bons colorants pour les bactéries. En 1928, Conn et Holmer recommandent d'ajouter des traces d'un sel de calcium, aluminium, magnésium ou plomb, et spécialement du chlorure de calcium, aux solutions de phloxine, d'éosine, d'érythrosine et de rose bengale. Enfin, Romell (1934) fait connaître un procédé de coloration des bactéries du sol avec une solution phéniquée de bleu solide acide R.

Jusque-là, ce sont à peu près exclusivement des fluorescéines qui ont été essayées comme colorants pour les microorganismes. Maneval a considérablement étendu le champ de ces investigations et essayé systématiquement bon nombre d'autres colorants acides. Il a employé notamment : la fuchsine acide et un vert acide (vert solide FCF) isolés ou en mélange, le bleu de méthyle et l'orseille BB.

MÉTHODES DE MANEVAL (1941)

Maneval conseille vivement l'emploi des colorants acides pour l'étude des bactéries et des levures. Le mode de préparation diffère, suivant qu'il s'agit de rosanilines ou de phtaléines.

1. Rosanilines. — Les solutions doivent être phéniquées, acétifiées et additionnées de perchlorure de fer.

Solution A

Sol. aq. d'acide phénique à 5 p. 100	30 cm ³
Sol. aq. d'acide acétique à 20 p. 100	8-10 cm ³
Perchlorure de fer à 30 p. 100	4 cm ³

Les rosanilines sont employées en solutions à 1 p. 100 dans l'eau distillée, on ajoute le colorant, à la totalité de la solution A, dans les proportions suivantes :

Fuchsine acide à 1 p. 100	1-2 cm ³
Bleu de méthyle à 1 p. 100	2-8 cm ³
Vert lumière à 1 p. 100	2-8 cm ³
(ou vert solide F.C.F.)	

Pour les autres rosanilines et pour l'orseilline BB, la solution A sera employée *sans perchlorure de fer* (1). On lui ajoutera :

Bleu solide acide R à 1 p. 100	15 cm ³
ou Orselline BB à 1 p. 100	5 cm ³

2. **Phtaléines.** — Ce sont l'éosine, l'érythrosine, la phloxine et le rose bengale.

Solution B

Acide phénique	5 gr.
Eau distillée	100 cm ³
Phtaléines	1 gr.

Verser ensuite, goutte à goutte, VI-VIII gouttes d'acide acétique à 20 p. 100, jusqu'à apparition d'un nuage, puis 20-50 cm³ d'alcool à 95°. Si le nuage ne disparaît pas, ajouter *une trace* d'ammoniaque avec une aiguille de verre.

Colorations

Maneval conseille l'usage général de la fuchsine acide et du vert solide. Mais il faut prendre de grandes précautions avec la fuchsine acide, extrêmement sensible aux moindres traces d'alcalinité : elle est rapidement décolorée, même par l'eau de conduite un peu calcaire. Beaucoup de personnes trouvent les verts peu agréables à l'œil, bien qu'ils donnent un excellent contraste avec la fuchsine acide.

Les étalements ou frottis doivent être parfaitement desséchés, mais *non fixés*.

1. **Mordancer**, par la solution A avant le bleu acide, l'orseilline et le rose bengale, puis laver à l'eau.

2. **Colorer** : en *dix secondes à une minute* pour la fuchsine acide et les verts ou pour la fuchsine acide suivie d'un vert ; en *deux à trois minutes* pour l'érythrosine et le bleu acide.

(1) On peut préparer de même, avec l'eau phéniquée acétique, *sans perchlorure de fer*, des *colorants basiques*, par exemple avec 2 à 3 cm³ de *thionine* à 1 p. 100 ou 2 cm³ de *safranine* à 1 p. 100. La thionine acide a déjà été proposée par Frost (*in* HEURIC 1947) pour la coloration des microcultures de bactéries (eau dist. 400 cm³, phénol 2 gr., 5, acide acétique glacial 20 cm³, thionine 1 gr.).

3. *Différencier* au besoin en quelques secondes par le colorant de fond (1).

Le vert solide FCF décolore très vite les fluorescéines et l'orseilline BB, plus lentement la fuchsine acide.

Le rose bengale et l'orseilline décolorent les bleus et le vert solide un peu moins vite.

Coloration des spores des bactéries

Mordancer pendant trois minutes par la solution A, puis laver.

Colorer en trois à cinq minutes par un des colorants rouges, puis laver.

Différencier en quelques secondes par un vert acide.

Coloration des ascospores des levures

Mordancer pendant trois minutes par la solution A, puis laver.

Colorer par l'orseilline BB ou le rose bengale, puis laver. Appliquer ensuite une légère couche d'encre de Chine diluée ou de nigrosine à 1 p. 100 et sécher.

RECHERCHES PERSONNELLES

Coloration des ascospores des levures

Nos recherches sur les colorants acides ont été entreprises à propos de la coloration des ascospores des levures. En effet, cette question présente une importance particulière. On sait que la recherche des ascospores est la première donnée à établir pour la détermination des levures et champignons levuriformes. En effet, si la levure en question donne des ascospores, il est facile de la placer dans le cadre des espèces déjà connues, les épreuves biologiques de fermentation et d'assimilation ne venant plus que comme complément de la détermination. Mais, si la levure ne donne pas d'ascospores, on devra chercher sa place parmi les levures anascosporées, et alors les épreuves biologiques passent au premier rang.

En réalité, les choses sont encore plus compliquées, parce que la formation des ascospores est un phénomène capricieux. Si elles apparaissent, le résultat positif est définitivement acquis, tandis qu'en leur absence un doute subsiste toujours, puisque cette absence peut être fortuite et due aux conditions de culture.

(1) Il s'agit ici d'une *différenciation par substitution*, sur laquelle nous reviendrons plus loin.

Milieu optimum pour la production des ascospores des levures et culture sur lames gélosées. — On sait qu'une des conditions qui favorisent l'apparition des ascospores des levures est l'inanition. Pour produire cette dernière, plusieurs procédés ont été imaginés. Le plus ancien est celui des blocs de plâtre : ces blocs ou disques, obtenus en coulant dans un moule approprié du plâtre gâché assez épais, sont placés dans un récipient plat recouvert d'une cloche ou plus simplement dans des boîtes de Petri. On a soin de les mouiller d'eau stérile. La couche de levures développées sur milieu gélosé est prélevée à la spatule et étalée sur le disque de plâtre. Les levures, ainsi privées de nourriture, mais maintenues en atmosphère humide, ne tardent pas, la plupart du temps, à former des ascospores, surtout lorsqu'il s'agit de *Saccharomyces*. Ce procédé antique, assez grossier et nécessitant un matériel encombrant, n'a pas tardé à être remplacé par la culture sur gélose inclinée, en milieu très pauvre. C'est ainsi qu'est né en 1908 le milieu de Gorodkova, glycosé à 1 p. 100.

On a aussi conseillé un moyen encore plus simple, c'est l'examen du contenu de très vieux tubes de cultures de levures, non encore desséchés. Théoriquement, l'épuisement du milieu devrait provoquer l'apparition des ascospores. Pratiquement, on trouve surtout des cadavres de levures dont le contenu est en état de désintégration, d'où les méprises dont ont été victimes Todd et Hermann, Windisch et d'autres.

Il ne semble pas qu'on ait songé à un moyen très simple d'affamer les levures et de les amener à sporuler : c'est de les cultiver sur une couche très mince de milieu nutritif qui ne peut que s'épuiser rapidement. Pour réaliser cette couche mince, la culture sur lames gélosées, suivant la méthode de Rivalier et Seydel, est un procédé de choix, à condition d'assurer un état hygrométrique suffisant. Le milieu sera une gélose peptonée à 1 p. 100 et glycosée à 2 ou même 1 p. 100 comme dans la formule de Gorodkova.

Par ce moyen, nous avons obtenu, d'une manière constante, une abondante production d'ascospores, même avec les *Debaryomyces*.

Le seul inconvénient, d'ailleurs bien léger, des cultures sur lames est qu'elles ne permettent pas l'emploi des colorants basiques, parce que ces derniers teignent aussi la couche de gélose.

Il y a donc le plus grand intérêt, non seulement à cultiver les levures sur des milieux favorables à la production des ascospores, mais encore à pouvoir déceler leur présence à coup sûr, même si elles sont très peu nombreuses. Pour cela, il y a bien l'examen direct, dans l'eau ou mieux dans le Lugol fort. Ce procédé peut

suffire pour les *Saccharomyces*, en particulier pour les très nombreuses formes du *S. cerevisiae*, chez lesquelles les ascospores sont en général très visibles et très nombreuses. Mais cette méthode risque d'être inopérante pour des levures telles que les *Debaryomyces* qui sont de petite taille et chez lesquelles l'ascospore unique peut être difficile à distinguer d'une vacuole glycogénique, même à un grossissement suffisant. Des zymologistes très exercés peuvent surmonter cette difficulté, mais elle arrête toujours les débutants.

Si l'on sort des levures ascosporées véritables pour passer aux anascosporées, que dire des cas dans lesquels certains observateurs ont cru voir des ascospores et les ont même décrites avec de grands détails ? Laissant de côté certaines confusions grossières, nous ne nous occuperons que des cas réellement critiques. La question reste encore en suspens pour les *Mycoderma*, les découvertes annoncées par Baltatu (1939-1940) demandant confirmation. Mais il y a deux autres cas pour lesquels l'erreur paraît manifeste.

D'abord, *Torulopsis neoformans* (= *histolytica*), agent d'une blastomycose humaine cosmopolite et généralement mortelle. Notons tout de suite que les colonies de cette levure ont tout à fait l'aspect de celles des autres *Torulopsis* : elles sont crémeuses, jaunâtres et coulantes. Aucun des nombreux spécialistes qui les ont étudiées n'y ont jamais trouvé d'ascospores. Pourtant, en 1936, Todd et Hermann ont annoncé avoir découvert ces ascospores. Ils ont même décrit une sorte de cycle à 34 phases, qui ne correspond à rien de ce que l'on sait de précis sur la formation des ascospores chez les levures, d'après les travaux de Guilliermond, Stelling-Dekker et de tous les spécialistes qui ont étudié cette question de cytologie.

Les observations de Todd et Hermann ont été faites à l'état frais, sans coloration. Les dessins sont grossiers et tout à fait dépourvus de précision : leur interprétation manifeste, de la part des auteurs, beaucoup d'imagination. Il ne semble pas qu'ils aient cherché, comme il aurait été logique, la présence d'ascospores chez d'autres représentants du genre *Torulopsis*. Ils se sont contentés de faire, contre toute vraisemblance, du *Torulopsis neoformans* un *Debaryomyces*. Cette opinion a été acceptée par un nombre restreint d'auteurs, pour les uns avec réticence, pour d'autres, notamment en Italie, avec faveur. L'un de nous a exprimé son avis sur la question dans son *Précis de Mycologie* (1945, p. 524).

Un autre exemple nous est fourni par la découverte, annoncée par E. Windisch (1938 et 1940), d'ascospores chez *Torulopsis pulcherrima* et *Candida tropicalis*. Ces ascospores se formeraient dans

des chlamydospores, par un processus qui n'est pas précisé. Il y aurait un cycle à 28 phases, qui, pas plus que celui de Todd et Hermann, ne correspond à rien de ce qui est connu chez les levures. Ces observations ont été faites à l'état frais, *sans coloration*, et les figures publiées ne sont pas plus convaincantes que celles de Todd et Hermann. Le caractère auquel il est attribué le plus d'importance est la présence de la « coque vidée » des asques, les ascospores étant « difficiles à voir » à cause de l'épiplasme (?) qui les enveloppe. Ces « coques vidées » seraient surtout fréquentes dans les vieilles cultures. En réalité, celles-ci renferment toujours de nombreux cadavres de levures qu'il est bien facile de confondre, avec un peu d'imagination, avec des enveloppes d'asques.

Les preuves cytologiques de la copulation de ces ascospores sont tout à fait insuffisantes et se réduisent à des affirmations, alors que, pour des questions de cette nature, l'hématoxyline ferrique seule peut mettre les faits en évidence. Aussi les figures données ne sont-elles pas du tout démonstratives.

Il y a aussi la question des *chlamydospores*. Evidemment, elles existent chez *Torulopsis pulcherrima* et sont connues depuis l'aurore des recherches zymologiques. Ce sont les belles cellules « *pulcherrima* », levures à graisse de Beijerinck, immédiatement reconnaissables à leur volume, leur réfringence, leur paroi épaisse, leur contenu lipidique, facilement colorable par le soudan III (bleu coton-soudan au lactophénol). Jusqu'à plus ample informé, elles sont considérées comme donnant, au moment propice, un tube germinatif. Mais elles peuvent aussi mourir sur place et prendre alors l'aspect de « coques vides ».

Pour *Candida tropicalis*, la présence de chlamydospores n'a jamais été signalée et reste tout à fait douteuse. Il y a bien des chlamydospores, nombreuses et évidentes, chez *Candida albicans* et ses satellites (*C. triadis*, *C. stellatoidea*), mais les spécialistes de la zymologie, notamment ceux de Baarn, n'en ont jamais rencontré chez *C. tropicalis*, espèce facilement reconnaissable à ses longues chaînettes de pseudo-conidies, à sa croissance en voile épais dans le lait qu'elle ne coagule pas et à ses caractères fermentatifs.

Nous donnons ces deux exemples avec détails pour montrer combien il est nécessaire et urgent de posséder une ou plusieurs méthodes électives et sûres pour la coloration des ascospores des levures. On évitera ainsi la publication de nouveaux travaux erronés, dont, malgré la critique, il reste toujours quelque influence, en vertu de l'autorité de la chose imprimée et aussi de la crédulité de beaucoup de biologistes.

Principes de la coloration des ascospores

La paroi des ascospores *mûres* se montre en général, chez la plupart des ascomycètes, *acidophile*, c'est-à-dire qu'elle se colore électivement par les colorants acides, notamment par les phtaléines du groupe de la fluorescéine (éosines, érythrosines, phloxines). Elle retient aussi ces colorants énergiquement, vis-à-vis des différenciateurs acides, et fait ainsi preuve d'une certaine acido-résistance.

Par exemple, si l'on colore par le Mann biacide des coupes d'un périthèce floconneux d'un *Arachniotus* (*A. ruber*), les asques, bien délimités par leurs groupes d'ascospores, montrent celles-ci colorées par une gamme de tons allant du rose vif au bleu violacé, cette dernière teinte étant celle des ascospores immatures, tandis que les ascospores mûres ressortent en rose vif. Il en est de même pour des périthèces d'*Aspergillus malignus* ou d'*A. nidulans* : on observe les mêmes réactions dans les périthèces des pyrénomycètes et les apothécies des pézizales.

C'est cette propriété des ascospores *mûres*, révélée par le Mann biacide, depuis longtemps remarquée et signalée par l'un de nous, qui nous a amené à employer les colorants acides pour la coloration des ascospores des levures.

Les ascospores des *Saccharomyces*, dont on a tenté la coloration le plus anciennement et le plus fréquemment, présentent encore une autre propriété, signalée par Beauverie dès 1917. C'est une très forte *acido-alcoolo-alcalino-résistance* après coloration par la fuchsine basique phéniquée. C'est sur cette propriété que repose l'emploi des deux méthodes classiques de Moeller et de Kufferath, destinées surtout aux ascospores des *Saccharomyces*. Si bizarre que ce soit, on les colore comme des bacilles tuberculeux, bien que leur paroi ne paraisse pas renfermer d'acide mycolique.

Critique des anciennes méthodes

1. Méthode de Moeller. — Cette méthode n'a pas été créée pour les ascospores des levures. C'est tout simplement un très vieux procédé de coloration des spores des bactéries, adapté plus ou moins bien à la coloration des ascospores.

A notre point de vue, cette méthode pêche par la base et n'est plus soutenable en ce qui concerne les levures. La préparation, fixée par la chaleur, est d'abord traitée par le chloroforme, puis lavée à l'eau (qui enlève difficilement le chloroforme très peu soluble), et enfin plongée pendant deux minutes dans une solution aqueuse d'*acide chromique à 5 p. 100*, puis lavée de nouveau à l'eau.

On ne saisit pas très bien la raison de ce traitement par l'acide chromique, surtout à une pareille concentration. On sait, en effet, depuis plus de 60 ans :

1° que l'acide chromique *dissocie* à la concentration de 0,01 à 0,20 p. 100 ; qu'il *fixe* de 0,20 à 0,50 p. 100 ; qu'il *dissocie* de nouveau aux environs de 1 p. 100, puis *devient destructeur à partir de 2 à 3 p. 100*, par suite de sa propriété oxydante ;

2° que l'acide chromique *gêne ou empêche la plupart des colorations*, surtout par les couleurs d'aniline, par suite de la formation de sesquioxyde de chrome, réaction qui n'a pas lieu lorsqu'il est combiné à d'autres acides dans des mélanges fixateurs, dont le prototype est le mélange chromo-acéto-osmique de Flemming (1884). Cet inconvénient est porté au maximum lorsque l'acide chromique n'est pas éliminé par un lavage prolongé à l'eau courante.

Il faut donc que les ascospores des *Saccharomyces* possèdent une vigoureuse affinité pour la fuchsine basique, pour pouvoir être colorées après un pareil traitement.

La suite de la coloration est celle de la méthode de Ziehl-Neelsen pour la coloration du bacille tuberculeux : coloration à chaud par la fuchsine basique phéniquée, décoloration par un acide minéral fort (acide sulfurique à 5 p. 100), dont l'effet destructeur s'ajoute à celui de l'acide chromique, et enfin coloration du fond par une solution quelconque de bleu de méthylène.

2. Méthode de Kufferath (1929). — Elle est très analogue à celle de Moeller, mais les principaux inconvénients, dont l'emploi de l'acide chromique, en ont été supprimés. Elle a été légèrement modifiée et simplifiée par Langeron et Guerra (1938), dont voici la façon de procéder :

Fixation de la préparation par la chaleur, à la température de l'ébullition, coïncidant avec l'étalement.

Coloration classique à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl.

Différenciation par l'alcool chlorhydrique à 1 p. 100 ou mieux par l'alcool lactique à 2 p. 100, beaucoup moins brutal.

Coloration du fond par le chlorhydrate de bleu de Nil à 1 p. 100, le seul bleu qui ne soit pas décoloré par l'encre de Chine.

Laver à l'eau et étaler, sur la préparation séchée, une couche bien uniforme d'encre de Chine diluée, qui, par contraste, précise les contours des asques.

Cette méthode colore parfaitement les ascospores *mûres* des *Saccharomyces*, qui apparaissent en rouge vif, les asques et les blastospores étant d'un bleu-verdâtre pâle.

Si la méthode de Kufferath colorait aussi bien les ascospores de toutes les levures ascosporées, il ne serait pas utile de chercher d'autres procédés. Malheureusement, en dehors des *Saccharomyces*, elle est souvent en défaut. C'est ainsi qu'elle ne colore absolument pas les ascospores si caractéristiques du *Schizosaccharomyces octosporus*, facilement colorables en bleu par le Lugol ou par le bleu coton au lactophénol.

En outre, les petites ascospores des *Debaryomyces*, levures que l'on rencontre si fréquemment, sont colorées très irrégulièrement et rarement d'une manière suffisamment élective pour être reconnues sans hésitation.

R. Vanbreuseghem a proposé récemment d'effectuer la coloration de Kufferath à froid, en faisant agir la fuchsine basique pendant 30 minutes, puis achevant comme plus haut. Les résultats ont été très satisfaisants, même pour les *Debaryomyces* (voir plus haut ce même fascicule).

3. Méthode de P. H. H. Gray (1941). — Cette méthode est beaucoup plus simple que les précédentes, mais elle emploie encore des colorants basiques. La solution colorante est un mélange :

Vert malachite	0 gr. 50
Fuchsine basique	0 gr. 05
Eau distillée	100 cm ³

Les cellules végétatives des levures se colorent en violet, les ascospores en bleu verdâtre. Ce colorant n'est pas seulement destiné aux ascospores des levures, mais aux spores et éléments végétatifs de tous les microorganismes.

4. Méthode de Mac Clung (1943). — Cette méthode emploie séparément et successivement deux colorants basiques :

A. Vert malachite	1 gr.
Eau phéniquée à 1 p. 100	100 cm ³
B. Safranine	0 gr. 5
Eau distillée	100 cm ³

Etaler, sécher et fixer par la chaleur.

Colorer par A en deux minutes et en chauffant avec précaution jusqu'à émission de vapeurs.

Laver en une minute à l'eau courante.

Colorer par B en 30 secondes, laver, sécher.

Les ascospores sont vertes sur fond rouge.

Ces deux dernières méthodes constituent un progrès par leur simplicité, la dernière surtout donne de bons résultats.

5. F. de Almeida et C. da Silva Lacaz (1943) colorent par le Ziehl, différencient par l'alcool-acide (chlorhydrique ou lactique), colorent le fond par le bleu de méthylène, puis traitent, comme E. Weiss, par le Lugol fort qui achève de mettre en évidence les ascospores.

Ces auteurs obtiennent rapidement des ascospores en cultivant les levures en eau de *fécule de pommes de terre*, au lieu de l'eau de pommes de terre préconisée par Langeron et Talice (1932).

6. E. Weiss (1933) a proposé l'emploi d'un mordant avant la coloration par colorants basiques pour mieux assurer la distinction entre les éléments végétatifs et les spores des champignons.

Le mordant est ainsi composé :

A. Alcool à 95°	100 cm ³
Tanin	100 gr.
B. Formol à 50 p. 100	92 cm ³ 5
Acide acétique cristallisable	7 cm ³ 5

Pour l'emploi, mélanger une partie de A avec deux parties de B.

Mordançage. — Verser le mordant sur la lame et chauffer pendant cinq minutes, jusqu'à émission de vapeurs, puis laver à l'eau chaude.

Coloration. — On peut colorer par le bleu de Löffler, le violet cristal, le vert brillant, la fuchsine de Ziehl ou la safranine. Chauffer pendant trois à cinq minutes, jusqu'à émission de vapeurs, puis laver à l'eau. Weiss intensifiait déjà la coloration en terminant par le Lugol fort.

Pour les *spores* (et les *ascospores*), mordancer comme plus haut, colorer par le bleu de méthylène ou le vert brillant, à chaud, puis différencier par un alcool acidifié à 1 p. 100 (par un acide minéral ou organique).

Colorer le fond par le Ziehl ou la safranine en 30 secondes, jusqu'à teinte rougeâtre. Laver à l'eau courante. Les éléments végétatifs sont rouges, les spores bleues ou vertes.

MÉTHODES PROPOSÉES

Nos critiques visent surtout l'emploi à chaud de colorants tels que le violet cristal phéniqué et la fuchsine basique phéniquée (Ziehl), parce qu'ils sont impropres à la coloration des cultures sur lames gélosées et parce qu'ils ne donnent pas (sauf pour les *Saccharomyces*) de coloration absolument sûre des ascospores.

1. Colorants basiques

On peut cependant se servir de colorants basiques, associés à d'autres colorants acides ou basiques, et obtenir avec sûreté des colorations très électives d'ascospores, même avec les *Debaryomyces*. Mais ces colorants ne peuvent servir pour les cultures sur lames.

Il faut choisir, parmi ces colorants, ceux qui ne nécessitent pas l'emploi de puissants différenciateurs à base d'acides minéraux et qui ne produisent pas sur les levures une coloration opaque, comme les deux mélanges précités.

On s'adressera donc, par exemple, au bleu de méthylène, sous la forme de *bleu phéniqué de Kühne*, ou encore à l'*azur II*, légèrement phéniqué.

Un autre colorant basique, à la fois très puissant et donnant des colorations transparentes, est la safranine, qu'on emploiera sous la forme de *safranine anilinée* de Babès-Duboscq, pour colorer les ascospores, et de *safranine* à 1 p. 100 dans l'eau, comme colorant de fond et différenciateur. D'ailleurs, avec ces colorants basiques, la différenciation se fera le plus souvent par substitution.

Bleu de méthylène phéniqué de Kühne

Nous avons associé avec succès le bleu phéniqué avec la *safranine* à l'eau (colorant basique) et avec l'*éosine*, l'*orseilline BB* et la *rosa azurine* (colorants acides). Voici les combinaisons qui nous ont donné les meilleurs résultats :

1. a. *Bleu phéniqué*.

b. *Safranine* à 1 p. 100 dans l'eau (ou préparée suivant la formule de Maneval sans perchlorure de fer).

Ascospores en bleu, levures en rouge.

2. a. *Bleu phéniqué*.

b. *Eosine jaunâtre* à 1 p. 100 dans l'eau.

Ascospores en bleu, levures en rouge.

3. a. *Bleu phéniqué*.

b. *Orseilline phéniquée* (formule Maneval).

Ascospores en bleu, levures en rouge, asques très nets.

4. a. *Bleu phéniqué*.

b. *Rosa azurine* à l'eau à 1 p. 100.

Ascospores en bleu, levures en rouge, asques très nets.

Ces procédés conviennent pour les étalements, mais non pour les cultures sur lames, à cause de la coloration de la gélose. Colorer

l'étalement dans l'ordre indiqué, d'abord en 30 minutes par le bleu, rincer à l'eau pour enlever l'excès de colorant, puis en une à cinq minutes par le colorant de fond. Rincer à l'eau et sécher.

Safranine anilinée

Nous avons trouvé une autre heureuse association, en traitant par le bleu coton acétique des préparations colorées d'abord par la safranine anilinée.

5. a. *Safranine anilinée vieillie* de Babes-Duboscq.

b. *Bleu coton acétique*.

Ascospores en rouge, levures en bleu.

Colorer, dans l'ordre indiqué, d'abord 20 à 30 minutes par la safranine, rincer à l'eau pour enlever l'excès de colorant, puis colorer le fond et différencier par le bleu coton acétique, en une à cinq minutes. Rincer à l'eau et sécher.

Cette méthode donne des résultats particulièrement beaux et un vif contraste entre les ascospores rouge vif et le fond bleu.

Bleu coton acétique

Eau distillée	100 cm ³
Bleu coton C4B de Poirrier	0 gr. 5
Acide acétique cristallisable	3 cm ³

Différenciation par substitution. — Dans ces cinq procédés, la différenciation se produit par substitution : c'est-à-dire que le colorant de fond chasse le bleu de méthylène ou la safranine des éléments auxquels ces colorants ne sont pas énergiquement fixés et s'y substituent à eux. Ce phénomène est bien connu : il a été étudié par Resegotti (1888) et mentionné dans le *Microtome's Vade-mecum* (10^e édition, 1937). C'est la *coloration par soustraction* de Heidenhain et la *préoccupation tinctoriale* de Unna (Langeron, *Précis de microscopie*, 7^e édition, 1948).

2. Colorants acides

Les colorants qui nous ont donné les meilleurs résultats sont : le *bleu de méthyle*, associé à l'éosine jaunâtre, à l'orseilline BB et à la safranine, puis l'éosine de *Höchst*, l'érythrosine, l'orseilline BB et la *fuchsine acide*, toutes quatre associées au bleu trypan, et enfin l'érythrosine associée au bleu diamine. Il est nécessaire de colorer dans l'ordre indiqué : en 30 minutes par le premier colo-

rant, destiné aux ascospores, puis, après lavage rapide à l'eau (sauf pour la fuchsine acide), en 5 minutes par le colorant de fond. Laver ensuite à l'eau et sécher. Dans certains cas, il faut encore différencier, après un rinçage rapide à l'eau, par l'orange G en solution très diluée dans l'alcool à 70°.

1. Bleu de méthyle

1. a. *Bleu de méthyle*, 30 minutes.
b. *Eosine jaunâtre* à 1 p. 100 dans l'eau. Procédé particulièrement recommandé, donnant un beau contraste.
2. a. *Bleu de méthyle*, 30 minutes.
b. *Orseilline BB*, formule Maneval.

Avec ces deux formules, les ascospores sont colorées en bleu, les éléments levuriformes en rouge plus ou moins foncé. Le bleu de méthyle est simplement dissous à 1 p. 100 dans l'eau distillée. Colorer dans l'ordre indiqué en laissant agir le bleu pendant 30 minutes ; rincer à l'eau pour enlever l'excès de colorant, puis colorer et différencier en une à cinq minutes par le colorant de fond. Ici encore, la différenciation a lieu par *substitution* (coloration par soustraction) (voir plus haut).

Ces formules, excellentes pour les étalements, *ne conviennent pas pour les cultures sur lames*.

2. Erythrosine

1. a. *Erythrosine phéniquée*, 10 minutes (20 à 30 minutes pour *Schizosaccharomyces octosporus*).
b. *Bleu diamine* à 1 p. 100 dans l'eau.
c. Différenciation par l'alcool orange.
2. a. *Erythrosine phéniquée*.
b. *Bleu trypan*.
c. Différenciation par l'alcool orange. Procédé recommandé comme donnant un contraste parfait.

3. Eosine

- a. *Eosine de Höchst* à 1 p. 100 dans l'eau.
- b. *Bleu trypan*.
- c. Différenciation par l'alcool orange.

4. Orseilline BB (1)

- a. *Orseilline BB* à 1 p. 100 (formule Maneval).

(1) Il est facile, avec le procédé orseilline BB-bleu trypan, de *différencier le mort du vivant* : colorer en 5 minutes par l'orseilline, laver et colorer le fond par le bleu trypan. Les parties vivantes se colorent en rose vif, les parties mortes (ou les éléments morts) en bleu pâle.

b. *Bleu trypan*.

c. Différenciation par l'alcool orange.

5. Fuchsine acide

a. *Fuchsine acide* à 1 p. 100 dans l'eau ; après coloration, égoutter sans laver.

b. *Bleu trypan*.

c. Différenciation par l'alcool orange.

Avec ces diverses formules, les ascospores sont colorées en rouge vif et les éléments levuriformes en bleu. Comme plus haut, le colorant acide rouge doit agir pendant 20 à 30 minutes ; rincer ensuite à l'eau (sauf pour la fuchsine acide qui serait décolorée), puis colorer en une à cinq minutes par le colorant bleu de fond. Différencier ensuite par l'alcool orange. Laver et sécher ou déshydrater suivant la marche habituelle pour monter au baume. Ici, la différenciation est produite à la fois par l'alcool et par un troisième colorant dissous dans cet alcool.

L'*érythrosine* à 1 p. 100 sera préparée soit suivant la formule de Maneval, soit suivant celle de Winogradsky, avec de l'eau phéniquée à 5 p. 100.

L'*orseilline BB* à 1 p. 100 sera préparée suivant la formule de Maneval.

L'*éosine de Höchst* et la *fuchsine acide* seront simplement dissoutes à 1 p. 100 dans l'eau distillée.

Le *bleu trypan* à 1 p. 100 sera préparé suivant la formule de Maneval, sans perchlorure de fer.

L'*alcool orange* est préparé en ajoutant à de l'alcool à 70° une petite quantité de solution aqueuse à 1 p. 100 d'orange G, de manière à colorer légèrement l'alcool. C'est le différenciateur qui a donné de si beaux résultats à Dobell dans sa méthode de Mann simplifiée (1919).

Chlamydospores. — L'un de nous a montré, avec P. Guerra (1938), que les chlamydospores *mûres* sont acidophiles et acido-résistantes. Plus tard (1945), il a étendu cette propriété à tous les organes spori-formes des formes parfaites ou imparfaites, faisant fonction de chlamydospores, c'est-à-dire de formes kystiques de conservation, cet enkystement pouvant avoir lieu, comme chez les protozoaires, à un stade quelconque du cycle. C'est le cas de la télentospore, et cela est si vrai qu'elle a été (et est encore) chez les Ustilaginales, prise pour une chlamydospore ; pourtant c'est elle qui assure le long stade saprophytique de champignons considérés, à tort, comme

parasites obligatoires (Ustilaginales, Urédinales). C'est encore le cas des hypnospores, oospores, zygosporos qui, pour la plupart, sont des chlamydospores fonctionnelles. Les ascospores uniques des *Debaryomyces*, à paroi verruqueuse, peuvent être considérées aussi comme des chlamydospores fonctionnelles. Tous ces éléments sont justiciables des méthodes dont nous proposons l'emploi.

RÉSUMÉ

Une étude critique des procédés employés jusqu'ici pour la coloration des ascospores des levures nous a amenés à renoncer aux méthodes imitées de celles qui servent à colorer les bacilles acido-résistants, notamment le bacille tuberculeux. On obtient beaucoup plus facilement des préparations très transparentes et bien contrastées, en utilisant non l'acido-résistance de la paroi des ascospores, mais son acidophilie, qui permet l'emploi de colorants acides, plus propres et plus électifs. On peut d'ailleurs employer aussi des colorants basiques autres que les épaisses solutions phéniquées qui servent aux méthodes de Gram et de Ziehl-Neelsen.

Nous recommandons, comme nous ayant donné des résultats particulièrement beaux, les procédés suivants :

1. Colorants basiques

1. Safranine anilinée de Babes-Duboseq, — bleu coton acétique.
2. Bleu de méthylène phéniqué, — orseilline.BB phéniquée.
3. Bleu de méthylène phéniqué, — rosa azurine à l'eau.

2. Colorants acides

1. Bleu de méthyle à l'eau, — éosine jaunâtre à l'eau.
2. Erythrosine phéniquée, — bleu trypan phéniqué, — alcool à 70°, — orange G.
3. Fuchsine acide, — bleu trypan phéniqué, — alcool à 70°, — orange G.

Pour obtenir une production régulière et abondante d'ascospores, nous conseillons l'emploi des cultures sur lames gélosées, enduites d'une gélose glycosée pauvre à 1 ou 2 p. 100 de glucose.

Les colorants basiques ne peuvent servir que pour les étalements, parce qu'ils colorent la gélose et nécessitent des différenciateurs très acides.

Par contre, les colorants acides colorent aussi bien les cultures sur lames que les étalements.

BIBLIOGRAPHIE

- ALMEIDA (F. DE) et LACAZ (C. DA SILVA). — Nova contribuição para o estudo dos ascos dos leveduras. *Anais Fac. med. S. Paulo*, XIX, 1943, 145-153, 2 pl.
- BALTATU (G.-H.). — *Mycoderma* als echte Saccharomyceten. *Ztrbl. f. Bakt.*, 2^e Abt., CL, 1939-1940, 196-225.
- BEAUVIERE (J.). — *C.R. Soc. de biologie*, LXXX, 1927, p. 5.
- CONN (H.-J.). — The microscopic study of bacteria and fungi in soil. *N. Y. Agric. exper. Station (Geneva), Techn. Bull.*, LXIV, 1918, 1-20.
- Rose bengal as a general bacteriological stain. *J. bact.*, VI, 1921, 253-254.
- Carbol crystal violet. *Stain technology*, XXI, 1946, 31-34.
- CONN (H.-J.) et collaborateurs. — *Biological stains*, 1940. Biotech. publications, Geneva, N. Y., U.S.A.
- CONN (H.-J.) et HOLMES (W.-C.). — Fluorescein dyes as bacterial stains, with special reference to their use in soil preparations. *Stain technology*, I, 1926, 87-95.
- FROST (W. D.). — *J. infect. dis.*, XXVIII, 1921, p. 176.
- GATENBY (J. Bronté) et PAINTER (Th.-S.). — *The microtome's vade-mecum* (Bolles Lee), 10^e édition, 1937, London, Churchill.
- GRAY (P.-H.-H.). — A solution for staining differentially the spores and vegetative cells of microorganisms. *Canad. J. res. (C.)*, XIX, 1941, 95-98.
- HUCKER (G.-J.). — Comparison of various methods of Gram-staining (Preliminary Report). *Abstr. bact.*, VI, 2, 1922.
- KUFFERATH (H.). — A propos des spores de *Pseudo-saccharomyces apiculatus* (Reess-Hansen) Klöcker. *Ann. soc. zymologie*, Bruxelles, I, 1929, 214-218.
- LANGERON (M.) et GUERRA (P.). — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Ann. de paras.*, XVI, 1938.
- LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*, 7^e édition, 1948, Paris, Masson et Cie.
- *Précis de mycologie*, Paris, Masson et Cie, 1945.
- MAC CLUNG (L.-S.). — On the staining of yeast spores. *Science*, XCVIII, 1943, 159-160.
- MANEVAL (W.-E.). — Staining bacteria and yeasts with acid dyes. *Stain technology*, XVI, 1941, 13-19.
- MANGIN (L.). — Recherches anatomiques sur les péronosporées. *Bull. Soc. hist. nat. Autun*, VIII, 1895.
- ROMELL (L.-G.). — A blue stain for microorganisms in humus and in soil. *Stain technology*, IX, 1934, 141-145.
- TODD (R.) et HERRMANN (W.-W.). — The life cycle of the organism causing yeast meningitis. *J. of bact.*, 32, 1936, 89-102, 3 pl.
- VANBREUSEGHEM (R.). — Sur l'emploi à froid de la méthode de Kufferath. *Annales de parasitologie*, XXII, 1947.
- WEISS (E.). — A simple method for staining fungi. *Proc. soc. exper. biol. med.*, XXX, 1933, 466-467, p. 235-236.
- WINDISCH (E.). — *Arch. f. Mikrobiol.*, XI, 1940, p. 368.
- WINOGRADSKY (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, XXXIX, 1925, 299-354, pl. IV.

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris (Directeur : Prof. E. Brumpt), Section de Mycologie (Chef de service : Dr M. Langeron).