Matériel et techniques pour l'étude morphologique, cytologique et ultrastructurale du *Sporotrichum schenckii* (Hetkoen et Perkins 1900)

par Monique THIBAUT

Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie (P^r M. LARIVIÈRE)
U.E.R. Cordeliers, 15, rue de l'Ecole de Médecine, F 75006 Paris

Résumé

La forme mycélienne, la phase tissulaire et les cellules de la phase levure du *Sporotrichum schenckii* (Hetkoen et Perkins 1900) ont été étudiées en microscopie photonique, en microscopie électronique à transmission et à balayage. Le présent article décrit les techniques utilisées pour ces recherches.

Summary

The mycelial phase, the tissue phase and the yeast — like cells of *Sporotrichum schenckii* (Hetkoen and Perkins 1900) were examined using the light microscope, the electron microscope and the scanning microscope. The present paper describes some technics for this study.

I. — Matériel.

Nous avons pratiqué nos recherches morphologiques, cytologiques et ultrastructurales, sur une souche du *Sporotrichum schenckii* (Hetkoen et Perkins, 1900) conservée dans la mycothèque du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de

Paris. Cette souche a été isolée en 1942, d'un cas de sporotrichose, chez un malade d'Afrique du Sud. La forme saprophytique est repiquée tous les mois, sur un milieu de Sabouraud gélosé et sur milieu au moût de bière gélosé. Elle est conservée à la température du laboratoire. Sa virulence est entretenue par des passages fréquents sur l'animal (souris, hamster). La transformation de la forme mycélienne saprophytique en forme levure, semblable à l'état parasitaire du champignon, est obtenue sur un milieu liquide complexe, riche en acides aminés, maintenu en anaérobiose et en agitation continue, à la température de 37°.

II. — Techniques d'étude pour la microscopie photonique.

A. — INOCULATION A L'ANIMAL POUR L'ENTRETIEN DE LA VIRULENCE DE LA SOUCHE.

Nombreux sont les animaux sensibles au *Sporotrichum schenckii* : rats, souris, hamsters, cobayes, lapins, chiens, chats et singes. On a même pu inoculer ce *Sporotrichum* à des embryons de poulet âgés de 12 jours.

1° Animaux utilisés.

L'inoculation à la souris blanche et au hamster constitue, comme la culture, un procédé de choix pour l'identification du parasite. Nous avons utilisé des animaux mâles.

2° Nature de l'inoculum.

Nous avons employé une suspension de conidies, dans du sérum physiologique, ces spores provenant d'une culture de 18 jours de la forme mycélienne du *Sporotrichum schenckii* sur milieu au moût de bière gélosé. Les conidies n'ont pas été décomptées.

3° Mode d'inoculation.

a) *Souris*. Des souris mâles pesant 20 grammes ont été séparées en deux lots :

- à chaque souris du premier lot a été injecté 0,05 ml de suspension de conidies, par voie intrapéritonéale ;
- à chaque souris du deuxième lot a été injecté 0,02 ml de la même suspension, par voie intratesticulaire.

b) *Hamsters*. Des hamsters mâles, pesant environ 150 grammes, ont été également séparés en deux lots :

- les hamsters du premier lot ont reçu chacun 2 ml de suspension conidienne par voie intrapéritonéale ;
- les hamsters du deuxième lot ont reçu 1 ml de la même suspension par voie intratesticulaire.

4° Etude mycologique et pathologique.

Nous avons sacrifié les animaux à des intervalles réguliers et pratiqué des autopsies complètes. L'inoculation à l'animal nous a permis, d'une part, d'observer les lésions anatomiques, d'autre part de pratiquer des frottis d'organes, des coupes d'organes et des rétro-cultures.

B. — EXAMEN MICROSCOPIQUE DIRECT A PARTIR DU MATÉRIEL PATHOLOGIQUE.

1° *Prélèvements.*

Les produits ou les organes pathologiques, nécessaires à l'identification du parasite, sont recueillis dans des boîtes de Pétri stériles, à l'aide, soit d'un fil de platine stérile, soit d'une pipette stérile, quand il s'agit de pus.

A partir de ces prélèvements, nous avons pratiqué un examen direct de frottis de pus et de frottis d'organes obtenus par apposition, et un examen histologique des organes eux-mêmes.

2° *Examen direct.*

Nous avons examiné les produits pathologiques au microscope :

- à l'état frais pour le pus ;
- sur des frottis, pour le pus et les organes.

Ces frottis ont été colorés au May-Grunwald-Giemsa, au bleu de méthylène et au Hotchkiss Mac Manus.

- sur des coupes histologiques colorées au Hotchkiss Mac Manus.

C. — CULTURES A PARTIR DU MATÉRIEL PATHOLOGIQUE : FORME MYCÉLIENNE ET FORME LEVURE.

1° *Les milieux de culture.*

a) *Milieu d'isolement* : Sabouraud, Actidione, Chloramphénicol. — Les produits pathologiques (pus, lésion cutanées et ganglionnaires, hépatiques) sont ensemencées sur le milieu suivant :

— Gélose	15	g
— Glucose	20	g
— Peptone granulé	10	g
— Eau distillée	1.000	ml
— Actidione (cycloheximide)	0,50	g
— Chloramphénicol	0,50	g

La stérilisation à l'autoclave a été effectuée de la façon suivante : la température a été portée à 120°, en 20 minutes. Le milieu est ensuite incliné, refroidi et solidifié.

L'addition d'actidione permet d'éliminer les saprophytes des genres *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*. L'incorporation au milieu de chloramphénicol, antibiotique à large spectre antibactérien, élimine les contaminants bactériens. Sa stabilité à la chaleur permet son incorporation au milieu de culture avant la stérilisation.

b) *Milieux de repiquage.* — La souche de *Sporotrichum schenckii*, une fois isolée à l'état pur, est repiquée régulièrement :

Pour la forme mycélienne :

— Sur un milieu au moût de bière gélosé, dont la composition est :

— eau distillée	} à/500 ml
— moût de bière	
— gélose	15 g

On stérilise à 120°, comme il a été dit plus haut.

Le moût de bière gélosé est un excellent milieu, donnant des cultures luxuriantes.

— Sur milieu de Sabouraud, de formule :

— gélose	15 g
— glucose	20 g
— peptone granulé	10 g
— eau distillée	1.000 ml

La forme mycélienne étant aérobie, le développement des cultures est favorisé quand les tubesensemencés sont laissés bouchés, mais non capuchonnés, à la température du laboratoire.

Pour la forme levure :

Nous avons obtenu la forme levure en repiquant la phase mycélienne sur l'un ou l'autre des milieux suivants :

— Sur milieu au sang :

— Bacto blood agar Difco	30 g
— Eau distillée	1.000 ml

Ce milieu a l'inconvénient de favoriser fortement la filamentisation des levures.

— Sur milieu liquide :

Les cultures en milieu liquide sont effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer de 125 ml, contenant 10 ml du milieu suivant :

— Glucose	3 g
— $\text{PO}_4 \text{Na}_2\text{H}$	2,38 g
— $\text{PO}_4 \text{K H}_2$	0,55 g
— $\text{SO}_4 \text{Mg}$	0,60 g
— K Cl	1 g
— Solution d'oligoéléments de Berthelot	X gouttes
— Thiamine	10 — 6
— Biotine	10 — 8
— Arginine	1 g
— Glycocolle	1 g
— Hydrolysate de caseïne	10 g
— Eau distillée qsq	1.000 ml

L'ensemencement du milieu se fait à partir d'une suspension de conidies du *Sporotrichum schenckii*. L'inoculum est de 10^6 germes pour 125 ml de milieu. Les fioles bouchées au coton sont capuchonnées car la transformation en levure ne se fait qu'en anaérobiose. Les cultures sont placées sur un secoueur et agitées de façon continue, dans les trois dimensions, à raison de 100 secousses par minute ; le secoueur étant placé dans une étuve à 37°.

2° Températures d'incubation.

a) 20° pour la forme mycélienne. — A la température du laboratoire (20°), on n'obtient que de très rares formes levures et un abondant lacs de filaments.

b) 37° pour la forme levure. — Sur le milieu liquide mentionné ci-dessus, en anaérobiose et avec agitation permanente, la température de 37° est celle qui convient le mieux pour la production de la phase levure.

3° Modes de culture.

Nous avons utilisé différents procédés de culture :

a) *En boîtes de Pétri.* — Le milieu (moût de bière ou Sabouraud) est coulé dans des boîtes de Pétri, refroidi, solidifié, ensemencé et incubé à 20°. Cette méthode permet l'étude de l'aspect macroscopique de la morphologie des cultures.

b) *En tubes.* — Le milieu, réparti en tubes, est incliné, solidifié et ensemencé. Les tubes non capuchonnés sont laissés à la température du laboratoire. Ce procédé permet l'examen des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques. Pour étudier les caractères microscopiques, on prélève stérilement un petit fragment avec un fil de platine et on le place sur une lame, dans une goutte de colorant. On le dilacère avec des aiguilles montées. On recouvre d'une lamelle et on l'examine au microscope.

c) *En fioles d'Erlenmeyer.* — Le milieu liquide, dont nous avons donné la constitution ci-dessus, est inoculé avec une suspension de conidies, agité et cultivé à 37°, ce qui permet d'obtenir la forme levure.

d) *Cultures sur lames.* — Le but de cette méthode est d'obtenir, au centre d'une lame porte-objet, une petite colonie mycélienne, pour en étudier la morphologie, les appareils sporifères et les spores, celles-ci demeurant, du moins théoriquement, en place.

Nous utilisons la technique suivante : des lames, conservées dans l'alcool, sont flambées au bec Bunsen et placées dans une boîte de Pétri stérile, sur un chevalet stérile. Avec une pipette coudée stérile, on dispose sur chaque lame, une goutte de milieu, préalablement liquéfié par la chaleur et l'on réaspire cette goutte aussitôt.

On touche avec une anse chargée de conidies le centre du milieu resolidifié. On ajoute au fond de la boîte de Pétri 10 ml d'eau distillée stérile, cela pour maintenir un certain degré hygrométrique.

Les boîtes sont placées dans une étuve à 20°. On surveille la croissance du champignon, que l'on arrête lorsque la culture paraît suffisante. Les boîtes sont alors sorties de l'étuve et les lames sont fixées.

Sous la loupe binoculaire, à l'aide d'une aiguille lancéolée, on fait sauter le bouton central de la colonie, de manière à ne conserver que la partie périphérique en voie de croissance. Les cultures sur lames sont ensuite colorées, déshydratées et montées au baume du Canada ou à l'Eukit, puis examinées à l'immersion.

e) *Frottis de cultures.* — Le mycélium de *Sporotrichum schenckii* étant très épais et caoutchouteux, nous avons également utilisé la technique des frottis par apposition sur lame d'un fragment de culture.

f) *Procédé de la goutte de culture réaspirée.* — Pour l'étude morphologique et cyto-logique de la forme levure, cultivée en milieu liquide, nous avons déposé sur chaque lame une goutte de suspension de la phase levurée, la goutte étant aussitôt réaspirée. Il reste donc sur la lame des levures en couche mince qui peuvent être examinées à l'état frais, colorées vitalement ou fixées et colorées.

D. — TECHNIQUES D'ÉTUDE DES CULTURES.

Pour l'étude de la forme mycélienne, comme pour celle de la forme levure, nous avons procédé aux examens suivants :

1° *Examen direct, sans coloration.*2° *Observation vitale :*

- dans le liquide de Ringer additionné de rouge neutre ou de Soudan III ;
- dans le vert Janus en solution dans du sérum physiologique.

3° *Colorations des cultures à l'état frais.*

Nous avons utilisé les colorants ci-dessous :

— lugol,	— orangé G,
— bleu coton lactique,	— Thionine phéniquée,
— bleu coton acétique,	— erythrosine,
— bleu de méthylène.	— May - Grünwald - Giemsa,
— bleu trypan,	— Mann biacide.

4° *Techniques histologiques et cytologiques pour l'étude des coupes de culture et des cultures sur lames.*a) *Fixation.*— *Fixateurs nucléaires :*

- Fixateur de Nawaschin,
- Fixateur de Helly,

— *Fixateurs mitochondriaux :*

- Fixateur de Meves,
- Fixateur de Regaud,

— *Fixateurs divers :*

- Vapeurs de formol,
- Formol à 10 %,
- Formol à 10 %, additionné d'acide osmique à 1 %,
- Flemming faible,
- Formol, alcool et acide acétique.
- Alcool, éther, formol et acide acétique,
- Carnoy,

b) *Colorations.*— *Colorations nucléaires :*

- Hémalum acide de Mayer,
- Hématoxyline ferrique,
- Hématéine - éosine,
- Carmin acétique,

— *Colorations mitochondriales :*

- Fuch sine d'Altmann.

— *Colorations diverses :*

- Hotchkiss-Mac-Manus,
- Vert de méthyle-pyrônine.
- Vert de méthyle,

5° *Techniques histochimiques et cytochimiques.*a) *Dans les parois.*— *Les composés chitinoïdes* ont été colorés par :

- L'encre stylographique Watermann bleu-noir, selon la technique proposée par M. Chadeaud. Elle agit grâce aux bleus acides qu'elle contient ;
- Le rouge Congo en solution aqueuse.

— *La callose* a été colorée par le bleu coton acétique.

— *Les composées pectiques* ont été colorés par le rouge de ruthénium en solution aqueuse.

b) *Dans le cytoplasme.*— *Les vacuoles* ont été colorées vitalement par :

- le rouge neutre,
- le bleu de crésyle en solution aqueuse, très diluée ; alcalinisée légèrement par quelques gouttes de potasse.

— *Le glycogène* a été mis en évidence par l'iode en solution iodo-iodurée. Parallèlement, des préparations témoins ont été traitées à la ptyaline.

— *Les lipides* ont été mis en évidence par :

- le Soudan III,
- le noir Soudan B,
- le bleu BZL à saturation dans l'alcool à 50 %,
- l'acide osmique à 1 %.

c) *Dans le noyau.*

- *L'acide Désoxy ribonucléique* a été mis en évidence par la réaction de Feulgen.
- Les acides ribonucléiques l'ont été par le test de Brachet.

III. — Techniques d'étude pour la microscopie électronique.**A. — OBTENTION DES PIÈCES.**1° *Découpage des fragments de culture, pour la forme mycélienne.*

Les extrémités distales du mycélium en culture sont prélevées et découpées en très petits fragments d'un demi-millimètre de côté. Ces fragments sont aussitôt plongés dans le fixateur.

2° Centrifugation des spores.

Les tubes de cultures contenant la phase mycélienne sont additionnés de sérum physiologique et agités vigoureusement, à la main, puis à l'agitateur mécanique, de façon à détacher les conidies des hyphes. La suspension de conidies est filtrée sur une grille métallique très fine qui retient les filaments mycéliens. Elle est ensuite centrifugée, puis le sérum physiologique est remplacé par le fixateur, dans lequel les conidies sont remises en suspension.

3° Centrifugation des cultures en milieu liquide, pour la forme levure.

La culture de la phase levure, en milieu liquide, est centrifugée. Le surnageant est rejeté. Il est remplacé par le fixateur dans lequel les levures sont remises en suspension.

B. — FIXATIONS.

Les fragments de mycélium, les culots de spores et les culots de levure ont été fixés par les procédés suivants :

1° Dans le permanganate de potassium, à des concentrations de 0,60 %, 1 % et 2 % dans le tampon acétate-véronal de pH 7,4, pendant une durée allant de trente minutes à deux heures ;

2° Dans la glutaraldéhyde à 1,5 %, à 3 %, à 4 % ou à 5 %, dans le tampon phosphate de pH 7,4, pendant des temps variant de deux heures à dix-huit heures. Les fixations à la glutaraldéhyde étaient suivies d'une post-fixation osmique à 2 %, dans le tampon acétate-véronal de même pH pendant une heure ou deux ;

3° Dans le tétr oxyde d'osmium à 2 %, dans le tampon acétate-véronal de pH 7,4 pendant deux heures ;

4° Dans le formol à 10 %, dans le tampon phosphate de pH 7,4 pendant quinze heures, avec post-fixation osmique à 2 %, dans le tampon acétate-véronal de même pH pendant deux heures.

Les différentes fixations ont été effectuées à la température du laboratoire, ou mieux dans la glace fondante. Les pièces ont été ensuite lavées dans le tampon correspondant, pendant deux heures pour les fixations permanganatées et osmiques, 24 heures pour les fixations aldéhydiques.

Pour les conidies, comme pour les levures, à chaque changement de bain (fixateur, tampon, alcool et oxyde de propylène), les cellules sont centrifugées, le surnageant est rejeté et les spores ou les levures sont remises en suspension dans le nouveau bain.

C. — DÉSHYDRATATION.

Les pièces ont été déshydratées par l'alcool et l'oxyde de propylène :

- alcool à 30° : 1/4 d'heure,
- alcool à 50° : 1/4 d'heure,
- alcool à 70° : 1/4 d'heure,

- alcool à 80° : 1/4 d'heure,
- alcool à 95° : 2 bains d'1/4 d'heure chacun,
- alcool à 100° : 6 bains d'1/4 d'heure chacun,
- oxyde de propylène : 3 bains de 20 minutes chacun.

D. — IMPRÉGNATION. INCLUSION. POLYMÉRISATION. ULTRAMICROTOMIE ET CONTRASTATION.

Les pièces ont été imprégnées, dans des mélanges à concentration croissante de résine époxy dans l'oxyde de propylène. Finalement, elles ont été incluses dans l'épon 812 ou l'araldite et polymérisées. Les coupes ont été pratiquées avec un ultramicrotome Sorvall-Porter-Blum MT 1, muni de couteaux de verre. Elles ont été recueillies sur des treillis recouverts d'une membrane de formvar pour le matériel inclus dans l'araldite, et sur des grilles à mailles fines sans membrane support, pour celui inclus dans l'épon. L'augmentation du contraste a été obtenue par l'acétate d'uranyle à 5 % en solution aqueuse (entre vingt minutes et trois heures) et le citrate de plomb pendant cinq à sept minutes.

E. — EXAMEN AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE.

L'examen et la photographie des coupes ont été effectués aux microscopes électroniques Hitachi modèle HU 11 B, Siemens Elmiskop I, Jem 100 U et Jem 100 B Jeolco. Les photographies ont été prises à des grossissements directs allant de 15 à 120.000.

IV. — Techniques d'étude pour la microscopie à balayage.

A. — LA FORME MYCÉLIENNE.

Des cultures sur lame de *Sporotrichum schenckii* ont été fixées aux vapeurs de formol pendant 24 heures. La gélose du milieu de culture a été éliminée en chauffant légèrement les lames, sur la veilleuse d'un bec Bunsen. Chaque culture a été alors détachée de la lame support, à l'aide d'une aiguille lancéolée et transportée sur un petit cylindre de cuivre. Les cylindres ont été placés deux à deux dans un évaporateur de carbone, où les cultures ont été d'abord recouvertes d'un mince film de carbone, puis d'une fine pellicule d'or. Les échantillons ont été ensuite examinés au microscope électronique à balayage J.S.M. U. 3 Jeolco, travaillant à des tensions d'accélération comprises entre 15 et 25 kilovolts.

Les images produites par les électrons secondaires ont été photographiées à des grossissements variant entre 5 et 20.000.

B. — LA FORME LEVURE.

La culture de forme levure, en milieu liquide, a été préalablement traitée au formol. Une goutte homogénéisée de suspension de levures a été déposée sur chaque cylindre de cuivre. Le matériel a été traité dans l'évaporateur de carbone, comme

précédemment. Les échantillons ont été examinés au microscope électronique à balayage, travaillant à une tension d'accélération de 25 KV. Les photographies ont été prises à des grossissements compris entre 3 et 10.000.

Bibliographie

- ANSEL (M.), 1957. — *Mycoses et champignons parasites de l'homme*. 1 vol., 346 p., Doin éd.
- BRACHET (J.), 1940. — La détection histochimique des acides pentoses nucléiques. *C.R. Acad. Sci.*, 133, 88-89.
- , 1942. — La détection histochimique et le microdosage des acides pentoses nucléiques. *Enzymologia* 10, 87-93.
- CAPORALI (L.), 1965. — Nouvelles observations sur la biologie du *Taphrina deformans* (Berk) Tul. Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris.
- CHADEFAUD (M.), 1969. — Remarques sur les parois, l'appareil apical et les réserves nutritives des asques. *Osterr. Bot.*, 2, 116, 181-202.
- DELAPORTE (B.), 1939. — Sur les acides nucléiques des levures et leur localisation. *Rev. gen. Bot.*, 51, 448-482.
- DESMOND (H.) KAY, 1965. — *Techniques for electron microscopy*, 1 vol., 560 p., Blackwell scientific publications, Oxford.
- DOP (P.) et GAUTIÉ (A.), 1928. — Manuel de technique botanique, *Histologie et microbiologie végétales*, J. Lamarre éd., Paris.
- FEULGEN (R.) et ROSSENBECK (H.), 1924. — « Mikroskopisch - chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten ». *Z. physiol. Chem.*, 135, 203-248.
- GOMORI (G.), 1952. — *Microscopic histochemistry: principles and practice*. 1 vol., Univ. of Chicago Press, Chicago.
- HESS (W. M.), 1966. — Fixation and staining of fungus hyphae and host plant root tissues for electron microscopy. *Stain Techn.*, 41, 37.
- JENSEN (W. A.), 1962. — *Botanical histochemistry: principles and practice*, 1 vol., Freeman et C° éd., San Francisco, London.
- LANCE (A.), 1958. — Recherches cytologiques sur l'évolution de quelques méristèmes apicaux et sur les variations provoquées par des traitements photopériodiques. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 18, 91-421.
- LANGERON (M.), 1949. — *Précis de Microscopie*, 1 vol., 1430 p., Masson éd.
- LISON (L.), 1960. — *Histochimie et cytochimie animales*, Gauthier-Villars éd., Paris.
- LUFT (J. H.), 1956. — Permanganate, a new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 799.
- , 1961. — Improvements in epoxy resin embedding methods, *J. Biophys. Biochem. cytol.*, 9, 409-414.
- MARTOJA (R.) et MARTOJA (M.), 1967. — *Initiation aux techniques de l'histologie animale*, 1 vol., 345 p., Masson éd., Paris.

- MILLONIG (G.), 1962. — Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation. In *Electron microscopy*, Proc., 5th Intern. Congr. Electron. Microscopy, 2, p. 8, New York, Academic Press.
- PEASE (D. C.), 1964. — *Histological Techniques for Electron microscopy*, 1 vol., 381 p., Academic Press, New York, London.
- REGAUD (C.), 1910. — Etude sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. *Arch. Anat. Micros.*, 11, 291-296.
- REYNOLDS (E. S.), 1963. — The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-215.
-