

RECHERCHES

SUR LA

GERMINATION DES SPORES ET LA CONJUGAISON CHEZ LES LEVURES

par M. A. GUILLIERMOND

(Planches 6 à 9)

I. HISTORIQUE

Hansen (1) a constaté que les spores du *Saccharomyces Ludwigi*, au lieu de germer comme les spores des autres levures par formations de bourgeons sur plusieurs points de leur surface, à la façon des cellules végétatives, se développent d'une manière spéciale: elles se fusionnent deux à deux, puis, donnent naissance à une sorte de tube germinatif (*promycélium* de Hansen), qui produit les nouvelles cellules par un cloisonnement transversal, accompagné d'un léger étranglement. Nous avons montré dans un précédent article (2) que ces fusions sont toujours accompagnées de fusions nucléaires; elles offrent donc tous les caractères d'une conjugaison isogamique et nous avons donc été amené à les considérer comme une fécondation. Cette conclusion ne cadrerait pas avec les données que l'on possède sur la copulation des Ascomycètes et avec les observations de Barker et les nôtres sur la conjugaison de certaines levures. Barker (3) avait décrit, en effet, une conjugaison isogamique précédant la formation de l'asque chez le *Zygosaccharomyces* et nous (4) avons obtenu des résultats analogues chez les *Schizosaccharomycètes*. Nous avons essayé d'interpréter la conjugaison du *S. Ludwigi* (2) de la manière suivante: si l'on assimile l'asque des levures à celui des Ascomycètes, on doit le considérer comme un appareil de réduction chromatique, ainsi qu'on l'admet généralement pour ces derniers; or, d'après cette manière de voir, dans le *Zygosaccharomyces* et les *Schizosaccharomycètes*, le tronçon sexué ou gamétophyte (à n chromosomes) comprendrait tout le développement végétatif de la

levure depuis des spores jusqu'à la conjugaison ayant pour résultat de donner naissance à la cellule mère de l'asque ; il serait donc très développé. Le tronçon asexué ou sporophyte (à $2n$ chromosomes) serait, au contraire, réduit à la cellule mère de l'asque depuis sa naissance jusqu'à la formation des spores. Dans le *S. Ludwigii*, le cycle évolutif serait l'inverse ; le gamétophyte réduit aux spores (depuis leur formation jusqu'à leur germination pendant laquelle elles subissent la conjugaison) serait très raccourci, aux dépens du sporophyte qui comprendrait tout le reste du développement.

Vers la même époque, Hansen (5), dans une note intitulée « La spore des *Saccharomyces* devenu sporange. » (où il montrait que dans les spores des levures se transforment directement en asques, si on les place dans un milieu défavorable, au moment où elles commencent à germer) avait signalé, dans la levure de Johannisberg, quelques cas de fusion entre les spores lors de leur germination. Plus récemment, Klöcker (6) en a retrouvé dans une levure nouvelle, découverte par lui, le *S. Saturnus*, et Lepeschkin (7) dans le *Sch. mellacei*. On sait, d'autre part, que Hansen en avait observé autrefois dans les spores du *S. cerevisiæ*, mais, dans ces dernières, les fusions, d'ailleurs exceptionnelles, diffèrent essentiellement de celles du *S. Ludwigii* et ne présentent morphologiquement aucune ressemblance avec une conjugaison.

Cet ensemble de résultats nouveaux était, *a priori*, en contradiction avec l'interprétation que nous avons donnée pour le *S. Ludwigii* et l'on était en droit de penser qu'il s'agissait plutôt, dans ces fusions, d'anastomoses analogues à celles que l'on rencontre parfois entre les spores (1) ou entre les articles de divers Champignons ;

(1) Les fusions qui s'accomplissent très fréquemment dans les conidies levures des Ustilaginées présentent, en effet, des caractères analogues. On sait que de Bary, frappé de leur analogie avec les conjugaisons, les avait prises pour des actes sexuels. Ces fusions sont aujourd'hui considérées comme de simples anastomoses ; elles ne sont pas accompagnées de fusion nucléaire, d'après Dangeard. Cependant, dans un travail tout récent, Federley (8) a constaté la fusion nucléaire dans les conidies levures de l'*Ustilago Tragopogi pratensis* ; mais les observations de cet auteur sont loin d'être suffisantes et n'apportent pas de preuves décisives. (Voir à ce sujet l'article de Massart (9). M^{lle} Popta (10) a observé aussi des fusions s'opérant constamment dans les spores des *Protomyces* au moment de leur germination ; ces fusions n'ont aucun des caractères de la conjugaison ; elles ne sont pas accompagnées de fusion nucléaire.

d'autant plus que la différenciation du noyau des levures, étant très délicate, peut prêter à des erreurs. En effet, les fusions qui sont presque générales entre les spores du *S. Ludwigii* n'étaient signalées qu'à l'état d'exception dans les autres levures ; mais l'argument le plus sérieux contre notre manière de voir était le fait constaté par Lepeschkin de la fusion des spores chez le *Sch. mellacei*, dans lequel nous avons nous-mêmes décrit une conjugaison au moment de la formation de l'asque : il paraît inadmissible qu'il puisse exister deux fécondations dans l'évolution d'un même organisme. Ces considérations nous ont donc amené à entreprendre de nouvelles recherches sur la germination des spores des levures, dans le but d'essayer d'éclaircir cette question.

II. TECHNIQUE

Nous avons fait sporuler sur tranche de carotte les levures que nous voulions étudier. Il existe toujours dans les cultures un nombre plus ou moins considérable de cellules qui sont devenues asporogènes : on peut augmenter très sensiblement le nombre des cellules sporogènes en employant les méthodes indiquées par Beyerinck et Hansen. On extrait, à l'aide d'un fil de platine, une masse de levure développée sur une tranche de carotte et ayant formé des spores, puis, on l'étale sur une lame que l'on place pendant vingt-quatre heures dans une étuve chauffée entre 55° et 60°. Les cellules n'ayant pas sporulé sont tuées à cette température et seules les spores résistent. Cette opération terminée, on humecte le contenu de la lame avec de l'eau et on le transporte à l'aide d'un fil de platine sur un tube à tranche de carotte stérilisé ; on obtient ainsi une culture très sporogène, issue seulement des spores de la culture précédente.

Pour suivre la fusion des spores en cultures sur cellules Van Tieghem, nous nous sommes servis, comme milieu de cultures, de jus de raisin à 8 % de gélatine.

Pour les études cytologiques, nous avons presque toujours fait germer les spores sur tranches de carotte. Les cellules extraites en grande abondance, à l'aide d'un fil de platine, d'une culture dont les cellules ont formé leurs spores, sont ensuite placées sur une

tranche de carotte stérilisée, puis laissées à l'étuve à 25° pendant un temps qui varie avec l'espèce de la levure et le stade de germination que l'on veut étudier. Malgré l'emploi de la méthode précédemment indiquée, il reste toujours dans les cultures un certain nombre de cellules ne sporulant pas : celles-ci se développent avant les spores et empêchent souvent de retrouver les stades de germination de ces dernières ; il y a donc avantage à étaler de nouveau les levures sporulées sur une lame que l'on chauffe pendant vingt-quatre heures à 55° ou 60°, avant de les faire germer sur tranche de carotte, de façon à tuer les cellules végétatives. Nous nous sommes assurés préalablement que ce traitement ne déterminait aucune variation dans le mode de germination des spores. Ce procédé a surtout l'avantage, comme nous le verrons plus loin, de permettre d'étudier d'une façon très précise la germination des spores de la levure de *Johannisberg*, qui sans cela pourrait prêter à certaines erreurs. Il a cependant l'inconvénient de donner des préparations moins belles où les spores sont parsemées de cellules végétatives désorganisées et mal colorées.

Afin de chercher à éviter toutes causes d'erreurs dans une question aussi délicate, nous avons perfectionné autant que possible la technique histologique que nous avons employée dans nos précédentes recherches (2). Au lieu de continuer, pour les fixations, l'usage de l'acide picrique ou de l'alcool, nous avons reconnu que le microformol (Bouin) donnait des résultats bien supérieurs ; aussi la plupart de nos fixations ont été faites à l'aide de ce procédé. La fixation dure douze heures, après quoi, on lave à l'alcool à 70°, renouvelé jusqu'à ce qu'il ne jaunisse plus par l'acide picrique ; ce lavage doit être effectué avec le plus grand soin. Un autre procédé qui donne presque toujours de très bons résultats est le liquide de Péreniy (1) ; on laisse agir le fixateur pendant 12 heures, puis on lave à l'alcool à 70°. Le liquide de Flemming peut être employé aussi, à condition toutefois de décolorer les cellules par le peroxyde d'hydrogène suivant la méthode d'Overton ; ce procédé est généralement inférieur aux précédents ; la pénétration ne se fait

(1) Acide chromique à 0,5 p. 100, 3 parties.

Acide nitrique à 10 p. 100, 4 —

Alcool. 3 —

en effet, pas très régulièrement dans toutes les cellules ; il permet cependant, avec des colorations à l'hématoxyline ferrique, d'obtenir quelquefois les détails de structure du noyau d'une façon plus nette qu'avec le picroformol. Le liquide de Lenhossék donne également de bons résultats ; d'autres, tels que les liquides de Zenker et de Tellysiuchy ont été essayés sans succès.

Dans quelques cas, on peut pratiquer des coupes à la paraffine : on coupe soit un amas de levures adhérentes, soit un fragment de carotte renfermant une couche épaisse de levures ; les résultats sont généralement peu satisfaisants.

Comme colorants, nous avons dû continuer l'usage de l'hémalun et de l'hématoxyline ferrique ; les procédés qui nous (11) avaient donné des résultats très satisfaisants dans l'étude des Ascomycètes ont été essayés sans succès, de même que certains réactifs employés dans ces derniers temps pour les Protozoaires tels que le bleu Marino : nous avons, cependant, obtenu parfois d'assez bonnes préparations avec la safranine lichtgrün et le bleu polychrome, mais les régressions sont extrêmement délicates et les préparations ne peuvent être conservées que dans le Baume de Canada lequel contracte fortement les cellules de levures.

Il n'existe pas de bons procédés de montage des préparations ; le meilleur est la glycérine gélatinée, mais il ne permet guère de conserver les préparations plus de six mois ou un an. Si l'on veut les conserver plus longtemps, il faut avoir recours au Baume de Canada, malgré ses inconvénients.

III. SACCHAROMYCES CEREVISIÆ, PASTORIANUS ET ELLIPSOÏDEUS

La germination de ces levures débute par un gonflement des spores, lesquelles bourgeonnent ensuite en tous sens à la façon des cellules végétatives. Nous n'avons jamais observé de fusions entre les spores (fig. 1). Il est vrai que ces fusions ne

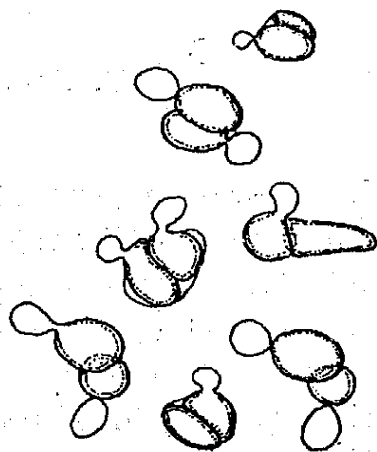


Fig. 1. — *Saccharomyces pastorianus*. — Germination des spores (tranche de carotte après 12 heures) ; gross. environ 1000.

sont signalées par Hansen qu'à l'état d'exception (1); d'ailleurs, de l'avis de l'auteur, elles n'ont rien de commun avec celles qui s'accomplissent dans le *S. Ludwigi*; en effet, elles ne consistent qu'en une dissolution progressive de la cloison qui sépare deux spores accolées l'une à l'autre, elles ne se produisent que lorsque le bour-

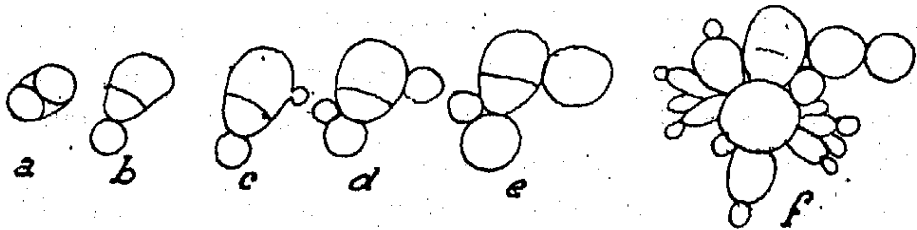


Fig. 2. — *Saccharomyces cerevisiae*. — Germination des spores; gross. environ 1000. Les deux spores se sont fusionnées à *f* par dissolution de la cloison séparatrice (d'après Hansen).

geonnement des spores est déjà très avancé et n'ont jamais lieu entre des formations nouvelles (fig. 2); Hansen (1) interprète ce processus comme une sorte de parasitisme: une des spores cherche à s'alimenter chez l'autre pour satisfaire aux exigences de la formation de nouveaux bourgeons. Par conséquent, ces fusions ne ressemblent en aucune façon à des conjugaisons et ne doivent pas nous préoccuper ici.

IV. SCHIZOSACCHAROMYCES MELLACEI

Les spores ne germent ordinairement qu'après la résorption de la membrane de l'asque. Cette résorption s'effectue de très bonne heure: les spores s'isolent ou restent groupées ensemble; elles se gonflent et donnent naissance chacune à un petit tube qui se cloisonne et produit de nouvelles cellules (fig. 3). Souvent, il arrive que quelques-unes d'entre elles commencent à former un petit mamelon, puis ce dernier arrête sa croissance; un autre mamelon se produit alors à côté, lequel se développe en un véritable tube de germination perpendiculaire au petit mamelon primitif: on obtient ainsi des figures ressemblant un peu à des T dont la barre horizontale comprend deux mamelons (fig. 3, *a*, *b*, *c*, *d*), l'un étant la spore et l'autre provenant du bourgeon avorté;

ces figures rappellent vaguement les stades de fusion des spores du *S. Ludwigii* et les deux mamelons dont nous venons de parler

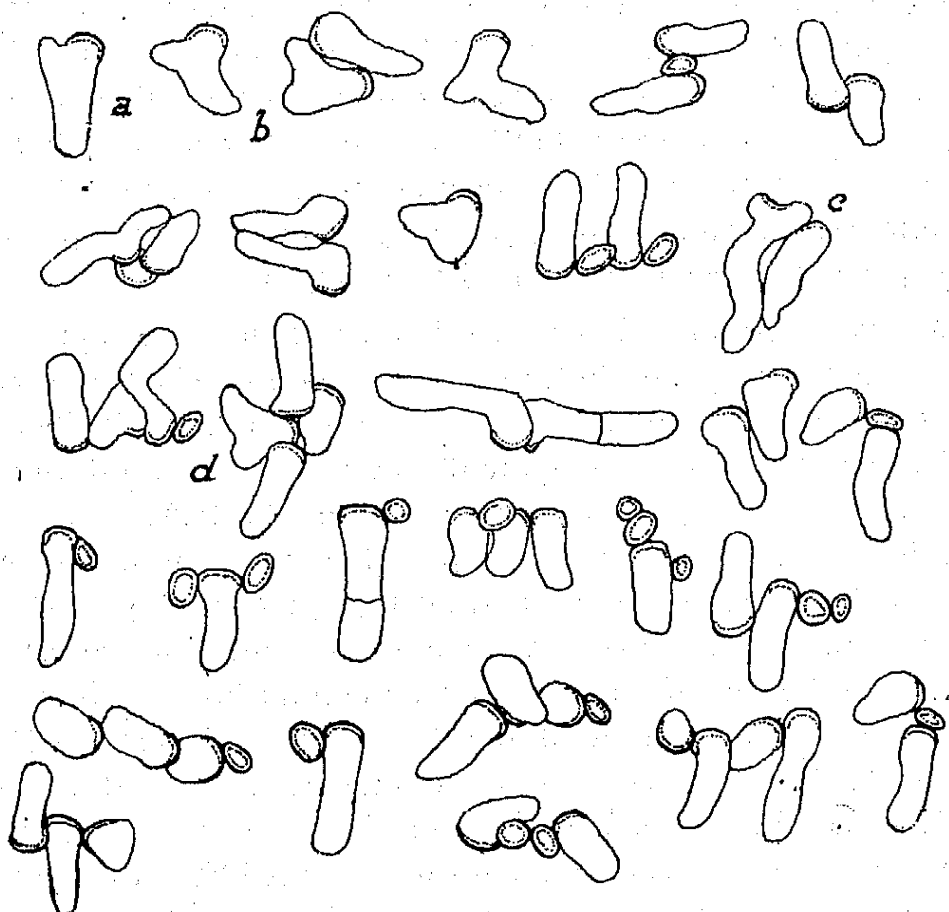


Fig. 3. — *Schizosaccharomyces mellacei*. — Germination des spores (tranche de carotte après 10 heures); gross. environ 1000.

pourraient être considérés comme des spores : c'est ce que Lepeschkin (7) avait attribué à tort à la fusion de deux spores ; en réalité, on ne constate pas de fusion entre les spores de cette levure.

V. SACCHAROMYCES LUDWIGII

Malgré le long article (2) que nous avons consacré aux fusions des spores du *S. Ludwigii*, nous avons pensé qu'il ne serait pas inutile de reprendre leur étude à l'aide de nouvelles méthodes.

Au point de vue morphologique, les nouvelles observations, que nous avons faites, préciseront certaines remarques que nous avons déjà laissées entrevoir. Rappelons d'abord brièvement comment

s'opère la germination des spores du *S. Ludwigi*. L'asque renferme presque toujours quatre spores : ces dernières naissent par paires aux deux pôles de la cellule mère de l'asque. Les deux spores de chaque pôle proviennent de la division d'un même noyau, elles sont donc sœurs : elles restent souvent soudées l'une à l'autre par une lame cytoplasmique, reste de l'épiplasme. A la maturité de l'asque, les spores sont très gonflées et occupent tout le volume de l'asque, mais elles restent soudées deux à deux par cette lame cytoplasmique, ce qui permet de reconnaître leur parenté.

Dans la germination des spores jeunes, la fusion s'opère, dans la règle, entre deux spores contiguës et provenant de la même division nucléaire : chacune émet un petit bec, les deux petits becs ainsi formés se rencontrent et se soudent en un canal de copulation. Cette fusion s'opère presque constamment dans l'intérieur de l'asque. Une fois qu'elle est effectuée, le canal de copulation ne tarde pas à donner naissance à un tube germinatif qui, en s'allongeant, perfore la membrane de l'asque : après avoir atteint une certaine longueur, ce tube se sépare du canal de copulation par une cloison transversale accompagnée d'une légère constriction, délimitant une cellule qui ne tarde pas de se détacher. La formation de cette première cellule est suivie de la naissance d'un grand nombre d'autres cellules se formant par le même procédé. Dans les levures ordinaires, le *S. cerevisiæ* par exemple, les spores germent d'une manière très différente ; elles ne produisent pas de tubes germinatifs et bourgeonnent en tous sens à la façon de cellules végétatives. Les spores du *S. Ludwigi* germent, au contraire, dans une direction déterminée par la formation d'un tube germinatif qui donne naissance aux nouvelles cellules par cloisonnement accompagné d'étranglement. Hansen (1), qui le premier remarqua cette particularité, a désigné ce tube germinatif sous le nom de *promycélium*, en le comparant aux promycéliums d'Urédinées et d'Ustilaginées. Nous avons déjà laissé entendre que cette expression de promycélium ne nous paraissait pas très exacte. Dans les Urédinées, en effet, le promycélium dérivé de la téléutospore est un tube cloisonné en quatre cellules dont chacune donne naissance à une basidiospore ; dans les Ustilaginées, les chlamydospores produisent aussi un tube cloisonné, dont chaque cellule fournit des conidies. Ces promycé-

liums sont considérés comme l'homologue des basides et les spores qu'ils produisent ont été assimilées à des basidiospores. Mais dans le tube germinatif du *S. Ludwigii*, nous ne constatons rien de semblable; la formation du tube de germination n'a rien de très particulier, si l'on considère que le canal de copulation est seul l'endroit favorable à la formation des nouvelles cellules, puisque les spores restent individualisées et sont enveloppées d'une membrane épaisse; de plus ce mode de multiplication des spores ne diffère pas, en réalité, du mode de multiplication des cellules végétatives de cette levure. On sait que, en effet, le *S. Ludwigii* se distingue de toutes les autres levures parce que ses cellules se divisent par un procédé intermédiaire entre le cloisonnement et le bourgeonnement; en outre, la formation des bourgeons, au lieu de s'effectuer à un endroit quelconque de la cellule, ne se produit guère qu'aux deux extrémités longitudinales de la cellule. Mais laissons pour un moment cette question.

Le mode de germination que nous avons décrit est le plus fréquent: il peut subir cependant de nombreuses variations. La fusion des spores ne s'opère pas toujours dès le début de leur développement: les deux becs destinés à se souder prennent alors la forme de tubes qui ne se fusionnent qu'après s'être plus ou moins allongés (fig. 4, c); c'est ce qu'Hansen avait déjà remarqué: il avait montré, en effet, que la fusion se fait tantôt entre les spores elles-mêmes, tantôt entre leurs promycéliums. Il peut se faire aussi que deux spores contiguës produisent chacune un petit bec en sens opposé: quelquefois ces becs s'allongent, forment de longs tubes qui finissent par se rencontrer et souder en décrivant une circonférence (fig. 4, a). Enfin, les spores, ne se développant pas toujours simultanément ou quelques-unes d'entre elles étant mortes, on voit parfois des fusions entre des spores non contiguës d'un asque ou même entre des spores appartenant à des asques différents, voisins l'un de l'autre (fig. 4). Dans ce cas, les spores sont obligées de fournir de longues protubérances pour arriver à se rejoindre; quelquefois même, ces protubérances renoncent à se fusionner: elles se cloisonnent et donnent des cellules par bourgeonnement latéral (fig. 4, b). Nous (4) avons signalé, dans le *Sch. octosporus*, des cas analogues de cellules éloignées ayant émis des protubérances très allongées pour se rejoindre et qui, sur le point de se fusionner, se

cloisonnent et deviennent le siège d'une multiplication cellulaire. Enfin, il existe toujours une certaine quantité de spores qui ger-

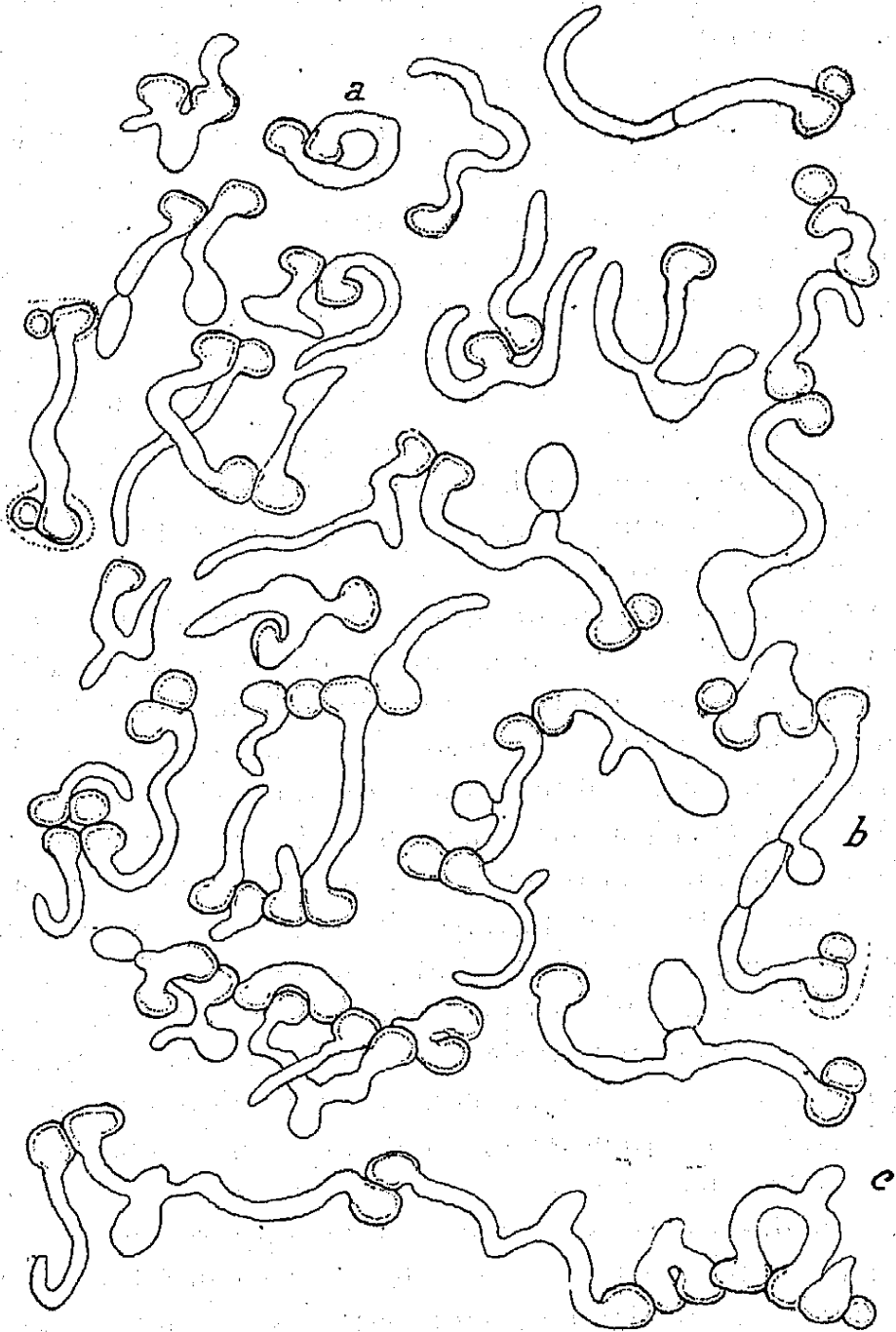


Fig. 4. — *Saccharomyces Ludwigii*. — Germination des spores âgées (tranche de carotte, après 12 heures) ; gross. environ 1000.

ment isolément ; ces dernières (fig. 4) fournissent chacune un petit tube qui prend la forme d'une cellule normale et se détache, mais

le plus souvent, elles produisent des tubes plus ou moins courbés qui après avoir atteint une longueur souvent assez considérable finissent par se cloisonner. Il paraît donc évident que ces tubes sont destinés à rechercher d'autres tubes émis par des spores voisines et que, s'ils finissent par se cloisonner, c'est qu'ils ont échoué dans leurs tentatives de fusion. C'est le cas que nous avons longuement décrit dans les Schizosaccharomycètes et que Barker a lui-même signalé dans le *Zygosaccharomyces*. Ces tubes, que Hansen appelle des promycéliums, n'ont donc d'autre signification que d'être des organes destinés à se fusionner et qui, lorsqu'ils n'y parviennent pas, finissent par germer directement en se cloisonnant. Ils n'ont rien de comparable aux tubes de germination fournis par les spores fusionnées; ces derniers, que Hansen avait aussi considérés comme des promycéliums, ne diffèrent pas sensiblement des cellules végétatives de cette levure. D'ailleurs, une preuve décisive nous est donnée par une variété du *S. Ludwigii* dont les spores germent toujours isolément. On se rappelle, en effet, que nous avons signalé dans nos précédentes recherches (4 et 12) une variété de *S. Ludwigii* toujours apogame; cette variété ne diffère par aucun autre caractère de la précédente; ses spores germent d'une manière un peu différente de celles qui germent isolément dans le *S. Ludwigii* typique: elles ne fournissent généralement pas de longs tubes germinatifs, mais elles se gonflent et se transforment chacune en une cellule végétative qui bourgeonne à son extrémité; elles germent donc comme les zygosporos de la précédente variété (fig. 5).

Hansen avait remarqué que les spores très anciennes subissent très rarement la fusion et germent presque toutes isolément; en outre, il avait observé que les promycéliums provenant de ces spores sont beaucoup plus développés que ceux des jeunes spores. En réalité, cette observation paraît être incomplète, car, en suivant très méticuleusement la germination des spores âgées, nous sommes arrivés à des résultats quelque peu différents. Le nombre des spores qui germent isolément est, en effet, beaucoup plus grand: cela tient à ce qu'un grand nombre de spores sont mortes: aussi celles, qui sont en état de germer, éprouvent-elles beaucoup plus de difficulté à se fusionner; étant fréquemment à côté de spores mortes, elles sont obligées beaucoup plus souvent de chercher à se fusionner

avec des spores d'autres asques et il y a moins de chance qu'elles en rencontrent. La fusion, qui presque toujours s'effectuait entre des spores contigües et sœurs, dans la germination de spores jeunes,

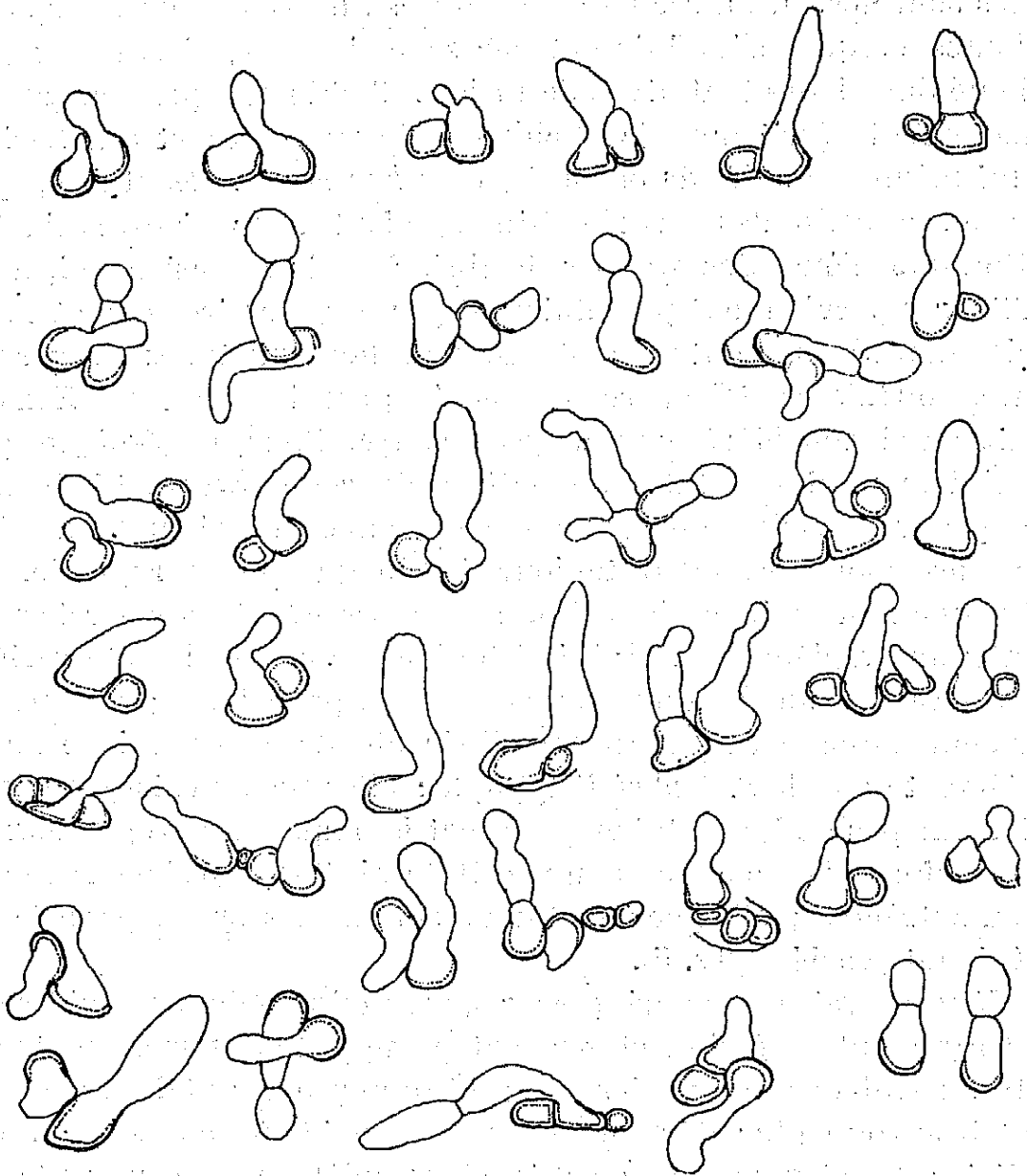


Fig. 5. — *Saccharomyces Luawigii* (variété apogame). — Germination des spores (tranche de carotte, après 12 heures); gross. environ 1000.

s'opère donc ici très fréquemment entre des spores appartenant à des asques différents. Il se passe ce que nous avons décrit dans les races de *Sch. octoporus* (2) manifestant une tendance à devenir asporogène. Pour cette même raison, les spores se fusionnent ordinairement

rement, plus tardivement, ce qui explique que Hansen, ne les ayant pas observées suffisamment longtemps, a pu croire que presque toutes germaient isolément. C'est du moins, croyons-nous, ce qui ressort de l'examen que nous avons fait des germinations de spores datant de six mois à un an.

Nous avons repris à l'aide de fixations au picroformol, au Péreniy ou au Flemming, l'étude cytologique des fusions des spores du *S. Ludwigii*. Grâce à ces fixations nous avons pu obtenir la différenciation de la structure du noyau : on se souvient, en effet, que dans nos recherches précédentes, nous n'avions pu différencier le noyau de cette levure, autrement que sous forme d'un corps sphérique homogène. Ce corps homogène n'était autre chose que le nucléole, la chromatine et la membrane se colorant très difficilement étaient restées inaperçues. On peut facilement étudier la structure du noyau dans les cellules végétatives jeunes : on y distingue un nucléoplasme incolore limité par une membrane colorée et dans l'intérieur du nucléoplasme quelques fins granules de chromatine toujours très difficiles à mettre en évidence et un nucléole ayant la forme d'un croissant, accolé à la membrane (Pl. 1, fig. 4).

Les colorations des premiers stades de la fusion des spores sont difficiles ; cela tient à ce que la fusion des spores s'effectue presque constamment dans l'intérieur de l'asque et que c'est seulement le tube de germination en se développant qui fait éclater la membrane de l'asque ; cette double membrane, celle de l'asque et celle de la spore, fait souvent obstacle à la pénétration des colorants : la différenciation du noyau est donc très délicate dans les stades de fusion des spores : aussi dans notre première étude, les méthodes que nous avons employées ne nous avaient pas souvent permis d'étudier ces premiers stades de la germination : nous avons pu depuis, avec des fixations au picroformol et surtout au Péreniy et des colorations à l'hématoxyline ferrique, suivre d'une manière très précise tous les stades de la fusion nucléaire. Des coupes très fines à la paraffine peuvent être parfois employées pour cette étude, bien qu'en réalité il n'y ait toujours qu'une certaine quantité des cellules qui soient coupées.

Au moment de la formation des deux petits becs émis par les deux spores qui vont se fusionner, le noyau de chacune des spores reste ordinairement à la place qu'il occupait primitivement, même

s'il se trouve à l'extrémité opposée au bec. Il ne s'introduit généralement dans le canal de copulation que lorsque la paroi séparatrice des deux cellules s'est résorbée et que la fusion des spores est effectuée : à ce moment, on observe des stades avec deux petits noyaux situés dans le canal de copulation, très rapprochés l'un de l'autre, et d'autres avec un seul noyau sensiblement plus gros que les deux précédents au milieu de ce canal (Pl. 1). On peut aussi rencontrer, mais beaucoup plus rarement, des stades à un noyau unique, très allongé, qui représente le stade de la fusion nucléaire (Pl. 1, fig. 11 et 14). Dans les stades à deux noyaux, ceux-ci étant très petits, il est rare que l'on puisse observer leur structure, mais il est plus facile de différencier cette structure dans les stades à un seul noyau. Pendant tous ces stades les deux spores restent très vacuolaires et remplies de corpuscules métachromatiques, tandis que le canal de copulation renferme un cytoplasme très dense, ce qui paraît indiquer qu'il s'y produit un mélange du cytoplasme des deux spores ; l'hémalum qui colore fortement le cytoplasme permet de se rendre compte de cette disposition.

La fusion opérée, le canal de copulation ne tarde pas à donner naissance au tube de germination (Pl. 1, fig. 31, 32, 34, 35, 40, 41) : ce n'est que lorsque ce dernier atteint sa dimension maxima que le noyau y pénètre et s'y divise, généralement par étranglement. Pendant le développement du tube de germination, le noyau grossit beaucoup et sa structure se laisse très nettement différencier. Remarquons que, dans tous ces phénomènes, le noyau montre une très grande indépendance vis-à-vis du cytoplasme, puisque la formation du canal de copulation et plus tard celle du tube de germination s'effectuent sans son concours. Nous avons déjà signalé cette particularité autrefois au sujet du bourgeonnement des cellules de levure.

La fusion nucléaire s'effectue de la manière que nous venons de décrire, dans la plupart des cas ; parfois, cependant, le phénomène s'opère de façon un peu différente. Ainsi, la fusion, au lieu de se produire dans le canal de copulation, peut s'opérer dans l'une des spores. D'autres fois, comme nous l'avons déjà dit, il arrive que la fusion des spores, qui généralement a lieu dès le début de leur gonflement, ne se fasse que tardivement (Pl. 1, fig. 20) : c'est ainsi que deux spores contiguës peuvent ne pas se développer simulta-

nément : l'une aura déjà émis un long tube de germination dans lequel le noyau a pénétré, tandis que la seconde, en retard, formera un petit bec qui finira par se fusionner à la base du tube dérivé de la première, ; on rencontre donc des spores fusionnées, ayant déjà donné naissance à leur tube de germination, et dont les deux noyaux ne sont pas encore copulés (Pl. 1, fig. 30); c'est, qu'en réalité, le tube de germination provient de l'une des spores, et que la seconde moins développée ne s'est soudée à la première que beaucoup plus tard. La planche 1 nous montre un grand nombre de figures de la fusion nucléaire. La figure 34 de la planche 1 représente deux zygosporos : dans la zygospore du haut, l'une des spores, avant de s'unir à sa congénère, avait déjà émis un petit bec ; celui-ci, n'ayant pu réussir à se fusionner, a arrêté son développement, pendant qu'un autre bec se formait à côté et parvenait à se conjuguer avec la spore voisine. Barker (13 et 23) a signalé plusieurs cas analogues dans la conjugaison du *Zygosaccharomyces*.

Hansen (1) avait constaté assez fréquemment la fusion de trois ou même de quatre spores ensemble ; nous n'avons remarqué qu'une ou deux fois, sur plusieurs centaines de préparations et sur des observations en cultures sur cellules Van Tieghem, des fusions de trois spores ; jamais nous n'avons rencontré de fusions de plus de trois spores. Ces fusions multiples constituent donc une anomalie excessivement rare dont Hansen s'est certainement exagéré la fréquence. Une fois, nous avons constaté la présence de trois spores fusionnées avec un seul noyau au milieu du canal de copulation, qui paraissait indiquer que les trois noyaux s'étaient fusionnés en un seul.

La présence de stades à un seul noyau succédant à des stades à deux noyaux, le noyau unique étant plus gros que les précédents, a été observée d'une manière très précise sur un nombre considérable de préparations et ne laisse pas place à d'autre interprétation que celle de la fusion nucléaire : celle-ci ne peut donc faire le moindre doute. En effet, l'existence de stade à un seul noyau succédant à des stades à deux noyaux ne peut pas être expliquée par une dégénérescence de l'un des deux noyaux, car on observerait probablement des traces de cette dégénérescence et, en tous cas, on ne trouverait pas de stades à deux noyaux très rapprochés l'un de l'autre au milieu du canal de copulation. Une autre objection plus sérieuse aurait pu nous être

faite après notre première publication sur cette question : les deux spores, une fois fusionnées, donnent naissance, au milieu de leur canal de copulation, à un tube de germination qui se sépare de ce dernier par une cloison et forme une cellule.* Cette cellule, une fois détachée, pourrait donc renfermer l'un des noyaux des deux spores, en admettant que la fusion n'ait pas lieu ; le canal de copulation ne posséderait plus alors qu'un seul noyau et nous aurions pu interpréter ce stade comme une figure où le canal de copulation n'a pas encore commencé sa multiplication et l'unique noyau comme le résultat de la fusion des noyaux primitifs. Mais les figures de ce stade diffèrent un peu de celles des stades précédents, par leur aspect extérieur : le canal de copulation, au lieu de présenter une surface ronde, montre généralement une surface plate par où s'est détachée la cellule ; en outre, presque constamment, la fusion des spores et la fusion nucléaire s'effectuent dans l'intérieur de l'asque, ce qui ne laisse plus dès lors aucun doute.

VI. LEVURE DE JOHANNISBERG II

La levure de Johannisberg II est une levure haute, découverte par Wortmann (14) en 1892 : ses cellules ressemblent un peu à celles du *S. cerevisiæ* et ne présentent aucun caractère bien particulier. Les asques renferment un nombre variable de spores, une à quatre ; le nombre le plus fréquent est quatre. Hansen (5) a étudié récemment la germination des spores de cette levure et a montré qu'elles germent d'une manière particulière : d'après cet auteur, au lieu de bourgeonner directement, elles s'allongent et produisent d'abord des tubes droits ou recourbés qui bourgeonnent ensuite sur toute leur surface. En outre, un certain nombre d'entre elles se fusionnent deux à deux avant de germer. Nous avons repris ces observations en cellules Van Tieghem ; les résultats que nous avons obtenus peuvent se résumer de la manière suivante : les spores se gonflent ; parfois elles commencent à germer dans l'intérieur de l'asque comme dans le *S. Ludvigii*, mais le plus souvent la membrane éclate au moment de leur gonflement. Tantôt elles germent isolément, tantôt elles se fusionnent deux à deux. Dans le premier cas, elles germent à peu près comme dans les levures ordinaires en bourgeonnant directement (fig. 6). Nous avons dit,

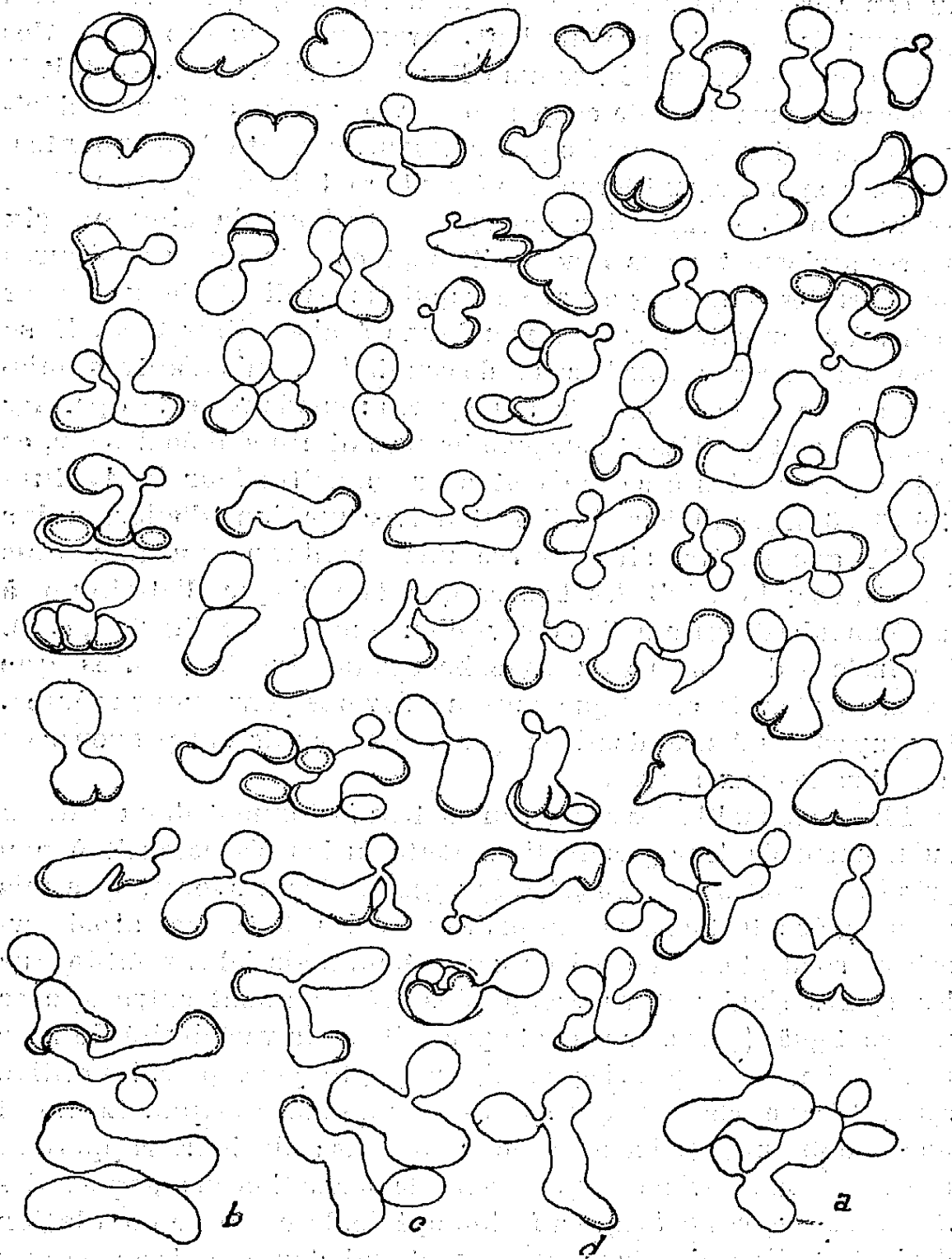


Fig. 6. — *Levure de Johannisberg II*. — Germination des spores (tranche de carotte, après 10 heures); gross. environ 1000.

au contraire, dans une note préliminaire (16), que les spores, germant isolément, produisaient, avant de bourgeonner, des tubes droits ou recourbés, comme l'avait décrit Hansen. C'était là une erreur, provenant de ce que nous avons pris les figures dérivant de la fusion de spores éloignées (lesquelles sont très fréquentes) pour des spores ayant formé isolément un tube de germination. En étudiant la germination des spores, au bout de cinq ou six heures seulement, on se rend facilement compte que ces figures sont formées d'un long canal de copulation reliant deux spores faciles à reconnaître par leur membrane épaisse. Plus tard, il se forme un bourgeon dans le canal de copulation, puis d'autres naissent sur toute la surface de ces figures : pendant ce temps, les spores se sont gonflées et leur membrane a diminué d'épaisseur, ce qui ne permet plus à ce moment de reconnaître leur individualité (fig. 6, *a, b, c, d*). Parfois, il peut arriver que l'une d'elles, moins gonflée que l'autre, ait conservé une membrane un peu plus épaisse, ce qui produit des figures que l'on risque d'attribuer à tort à un tube de germination dérivé d'une seule spore (fig. 6, *b, c, d*). Les fusions de spores sont donc beaucoup plus fréquentes que Hansen ne l'avait cru et que nous ne l'avions pensé nous-mêmes. La plupart des figures dessinées par Hansen paraissent provenir de la fusion de deux spores.

Plus de la moitié des spores, en effet, se fusionnent deux à deux au moment de leur germination. Cette fusion s'accomplit à peu près comme dans le *S. Ludwigii* (fig. 6). Les deux spores, une fois gonflées, émettent chacune un petit bec et les deux becs ainsi formés se soudent en un canal de copulation, mais ici il semble que les spores s'unissent beaucoup plus fréquemment entre spores non contiguës (fig. 6), sans doute par suite de la variabilité de leur nombre dans les asques, lequel, n'étant pas toujours pair, les oblige souvent à aller chercher des spores dans un autre asque. La fig. 6 nous montre un grand nombre de ces fusions : plusieurs rappellent celles que nous avons figurées dans la formation des asques des *Sch. Pombe* et *mellacei* (4). La fusion opérée, le canal de copulation devient le siège d'un bourgeonnement qui donne naissance aux nouvelles cellules. Assez souvent, les bourgeons, au lieu de se former au milieu du canal de copulation, prennent naissance dans l'une des spores à un point où la membrane offre peu de résistance.

Jamais, sur un très grand nombre de germinations, nous n'avons rencontré de fusions multiples. Hansen, au contraire, avait signalé comme assez fréquente la fusion de trois spores. De même que Hansen, nous avons parfois constaté dans les germinations sur carotte des spores soit isolées, soit fusionnées se transformant directement en asques.

Passons maintenant à l'étude cytologique de ces fusions. Dans les cellules végétatives, le noyau montre une structure différenciée analogue à celle du *S. Ludwigi*; il est généralement plus gros et possède un nucléole volumineux accolé à la membrane et ayant une forme qui ressemble plus ou moins à un croissant; la membrane se distingue difficilement (Pl. 2, fig. 1 à 3). La division s'effectue toujours par amitose. Remarquons, en passant, que le noyau se montre toujours très indépendant du cytoplasme dans le bourgeonnement. Il ne se divise guère que lorsque le bourgeon a acquis sa taille maxima. Parfois même, il nous est arrivé d'observer des cellules avec un bourgeon volumineux ayant déjà commencé à bourgeonner lui-même, alors que le noyau n'était encore qu'en voie de division dans la cellule mère du premier bourgeon. On observe dans les vacuoles des corpuscules métachromatiques en abondance.

La fusion nucléaire est plus difficile à démontrer que dans le *S. Ludwigi*: en effet, la plupart des spores germant après la rupture de la membrane de l'asque, il est très difficile de distinguer les stades où les spores viennent de se fusionner des stades ultérieurs où la zygospore a déjà fourni un bourgeon qui s'est détaché. Il est nécessaire, pour éviter toute erreur d'interprétation, de rechercher, sur les tubes de carottes où l'on fait germer les spores, le moment précis où la plupart de ces dernières ont commencé à se fusionner et où pas une d'elles ne s'est encore multipliée. La germination des spores de cette levure est beaucoup plus rapide que celle du *S. Ludwigi* et ce moment varie entre la cinquième et la sixième heure. L'emploi de la méthode indiquée plus haut, pour tuer les cellules végétatives qui accompagnent nécessairement les asques, fournit la preuve qu'aucune cellule n'a été produite par les spores fusionnées, s'il n'existe dans les préparations que des stades de fusion et des cellules végétatives désorganisées. D'ailleurs, même sans avoir recours à ce procédé, on rencontre

parfois des spores fusionnées à l'intérieur de l'asque et renfermant un seul noyau, qui prouvent d'une manière très précise la fusion nucléaire. (Pl. 2, fig. 56, 61, 74, 81, 82). Cette dernière s'accomplit comme dans le *S. Ludwigi*. Les spores renferment un seul noyau dont la structure est difficile à différencier, étant donné sa petitesse, mais, dès qu'elles ont commencé à gonfler et à émettre leurs petits becs destinés à se fusionner, la structure du noyau devient apparente. La formation des petits becs s'accomplit d'ordinaire sans le concours du noyau; ce n'est que lorsque la fusion est opérée que le noyau de chaque spore s'introduit dans le canal de copulation; on observe alors, dans ce canal, des stades à deux petits noyaux plus ou moins rapprochés et d'autres à un seul noyau plus gros que les précédents (Pl. 2 et Pl. 3). Le noyau de cette levure étant beaucoup plus gros que celui du *S. Ludwigi*, il est facile de suivre les phases de la fusion nucléaire qui sont représentées par des stades à deux noyaux accolés l'un à l'autre et par d'autres à un seul noyau très allongé dont le nucléole présente des formes variables, qui d'ordinaire ressemblent à deux croissants réunis par l'une de leur extrémités ou à un seul croissant très allongé ou encore à un haltère (Pl. 2, fig. 48 à 73). La fusion nucléaire se fait généralement au milieu du canal de copulation, mais souvent aussi dans l'une des spores. La fusion opérée, le premier bourgeon ne tarde pas à apparaître: la division nucléaire ne se produit que quand ce dernier a acquis sa taille maxima; elle se fait toujours par allongement suivi d'étranglement (Pl. 3, fig. 30 à 36).

Un fait extrêmement curieux est que la formation du premier bourgeon, dérivé du canal de copulation, s'opère dans un grand nombre de cas, avant la fusion nucléaire, si bien que l'on serait parfois tenté de croire que cette dernière n'a pas lieu. Assez souvent, en effet, ce n'est que lorsque le premier bourgeon a commencé à apparaître ou même lorsqu'il a acquis une certaine dimension que les deux noyaux s'accolent et se fusionnent (Pl. 2, fig. 33 à 41).

Cela témoigne d'une grande indépendance entre le noyau et le cytoplasme; nous avons eu déjà l'occasion, au cours de cet article, d'attirer l'attention sur cette indépendance dans le bourgeonnement des levures. Des faits analogues ont été observés tout récemment par Maire (17) dans le bourgeonnement des conidies levures

des Basidiomycètes et par Chodat et Crétier (1) (18) dans les ramifications de certaines Algues. Il est curieux de rencontrer ici cette indépendance entre le noyau et le cytoplasme jusque dans la conjugaison. La figure 37 de la planche 3 représente deux spores en voie de conjugaison : la cloison séparatrice n'est pas encore résorbée ; l'une d'elles a déjà commencé à bourgeonner.

On observe des anomalies encore plus curieuses : dans quelque cas, la fusion nucléaire paraît ne pas avoir lieu ; les deux noyaux semblent rester séparés. On trouve, en effet, des figures où le bourgeon ayant déjà atteint sa taille maxima ne tardera pas à se séparer de la zygospore et dans lesquels il existe encore au milieu du canal de copulation deux noyaux généralement assez rapprochés, quelquefois accolés l'un à l'autre, mais pouvant être aussi très éloignés : il est peu probable que la fusion s'effectue dans ces cas ; dans d'autres figures, on observe le passage de l'un des deux noyaux dans le bourgeon : le noyau le plus rapproché de ce dernier s'introduit en s'étirant dans le col qui unit le bourgeon à la zygospore, puis pénètre dans le bourgeon, tandis que le second noyau reste dans la zygospore. Les figures de 40 à 50 de la planche 3 représentent ces différents stades. L'interprétation de ces anomalies offre de grandes difficultés. Nous avons d'abord pensé, au début de nos recherches, que ces figures à deux noyaux, avec un bourgeon déjà presque entièrement formé, représentaient des stades où, les noyaux primitifs s'étant fusionnés antérieurement, le noyau copulé s'était déjà divisé dans l'intérieur de la zygospore pour fournir le noyau destiné au bourgeon ; bien plus, les deux noyaux étant souvent accolés et leur membrane séparatrice étant très peu distincte, nous avons pensé un moment que quelques-unes de ces figures pouvaient être considérées comme des stades d'anaphase d'une mitose. Nous avons dû bientôt abandonner cette interprétation ; dans le cas normal, la fusion nucléaire s'effectue, en effet, très tardivement, souvent après l'apparition du rudiment du premier bourgeon : de plus la division nucléaire ne commence que lorsque le bourgeon est déjà entièrement développé et se fait toujours par amitose, aussi bien dans le bourgeonnement des cellules

(1) Dans un mémoire récent, Chodat et Crétier taxent d'exagération la théorie d'Haberlandt relative à la fonction membranogène du noyau.

végétatives que dans celui des zygospores. Les trois hypothèses suivantes restent possibles :

1° Si l'on considère que les deux noyaux, qui sont généralement assez rapprochés l'un de l'autre au moment où l'un d'eux pénètre dans le bourgeon, sont nettement distincts, il faut admettre que dans certains cas la fusion des noyaux n'a pas le temps de s'effectuer, le bourgeonnement étant très rapide : étant donné les théories admises, il semble que l'on ne pourrait interpréter ce phénomène que comme un cas particulier d'apogamie. On doit convenir, d'ailleurs, qu'il n'y aurait pas à s'étonner outre mesure d'un pareil mode d'apogamie : il n'y a pas une différence essentielle entre le cas, que nous venons de signaler, où les deux gamètes mélangeraient leur cytoplasme, mais germeraient sans que la fusion nucléaire ait eu lieu, et le cas très répandu dans certaines Algues et dans certains Champignons (*Mesocarpus*, *Spirogyra*, Mucorinées) de deux gamètes qui se réunissent par un canal de copulation, mais qui, la cloison séparatrice des gamètes ne se résorbant pas, n'arrivent pas à accomplir leur fusion et produisent chacun une parthénospore.

Quoi qu'il en soit, ce phénomène mériterait d'attirer particulièrement l'attention, car jamais jusqu'ici il n'en a été signalé de semblable dans aucun organisme.

La levure de *Johannisberg* (1) montrerait donc une tendance très accusée à l'apogamie, qui se manifesterait non seulement par un grand nombre de spores germant isolément, mais encore par des fusions de spores non accompagnées de fusion nucléaire.

Si l'on ajoute à cela que, très fréquemment, les zygospores commencent à bourgeonner avant que la fusion nucléaire soit

(1) Les levures sembleraient donc nous offrir, comme d'ailleurs cela paraît se rencontrer dans beaucoup de Champignons (*Saprolégniacées*) et Algues (*Diatomées* (19), *Cutleriées* (20), toute une gamme de phénomènes d'apogamie. En effet, les levures les plus répandues ont perdu toutes traces de sexualité ; quelques espèces seulement présentent des conjugaisons : encore ces dernières ont-elles une tendance à devenir apogames et nous offrent-elles de nombreux exemples d'apogamie. On se souvient que nous avons signalé autrefois (21) deux variétés de *Sch. mellacei* : l'une présente des conjugaisons et l'autre est entièrement apogame. De même, dans le *S. Ludwigii*, nous avons fait connaître, à côté de la variété que nous avons étudié dans cet article, une variété toujours apogame ; nous donnons quelques figures de la germination des spores de cette dernière (Fig. 5). La levure de *Johannisberg* viendrait donc s'ajouter à cette série.

achevée, on arrive à cette conclusion que la fécondation semblerait avoir perdu son utilité dans cette levure.

2° Malgré toutes nos tentatives de fixations et de colorations diverses, nous n'avons pu parvenir à observer d'une manière très nette, dans ces figures, la membrane nucléaire et il est impossible dans beaucoup de cas de savoir si les deux noyaux sont bien distincts et si on n'a pas affaire à un seul noyau très allongé qui proviendrait de la copulation des deux noyaux primitifs, mais dont les deux nucléoles n'auraient pas subi la fusion. En effet, les figures, qui nous intéressent, renferment deux noyaux formés chacun d'un nucléole en croissant et d'une vésicule claire de nucléoplasme, logée dans la concavité du nucléole ; les deux noyaux sont souvent très rapprochés l'un de l'autre et on ne distingue pas toujours leur séparation : les deux nucléoles sont opposés et se regardent par leur concavité ; ils sont réunis par une bande de nucléoplasme renfermant plusieurs ou généralement un seul filet chromatique et on n'observe pas distinctement la ligne de démarcation des deux noyaux. On pourrait donc supposer que l'ensemble de ces deux nucléoles réunis par du nucléoplasme représente un seul noyau allongé avec deux nucléoles. Les figures, où l'un des noyaux paraît s'introduire dans le bourgeon, pourraient être considérées comme des stades d'une division indirecte de cet unique noyau ; les deux noyaux fils provenant de cette amitose renfermeraient chacun l'un des deux nucléoles du noyau primitif sans que ceux-ci aient eu besoin de se diviser. Mais on peut objecter à cette manière de voir que, dans un assez grand nombre de cas, les deux nucléoles sont beaucoup trop éloignés l'un de l'autre pour être réunis dans un même noyau, et que parfois les deux noyaux paraissent être très nettement individualisés.

3° On sait que dans la fécondation les noyaux des deux gamètes ne se fusionnent pas toujours immédiatement (22) : dans beaucoup de cas, ils s'appliquent seulement l'un contre l'autre et ils ne se confondent en un seul noyau que pendant la première mitose. Bien plus, chez certains animaux, les Copépodes, par exemple, non seulement les noyaux sexuels conservent leur individualité, mais ils se divisent, pendant les premiers stades de la segmentation, simultanément sans se confondre, et ce n'est qu'après un certain nombre de mitoses, qu'ils finissent par se confondre en un seul noyau. Etant

donné ce qui précède, on pourrait supposer que, dans la levure de Johannisberg, il y a, dans la plupart des cas, fusion totale des noyaux au moment de la fusion des gamètes, et que, dans quelques cas, ceux dont nous nous occupons, les deux noyaux ne font que s'accoler : en effet, nous avons parfois rencontré des figures où les deux noyaux paraissent se diviser simultanément dans le col du bourgeon, mais ces figures, par suite de leur rareté, peuvent être aussi attribuées à des mauvaises fixations ; d'un autre côté, dans la plupart des cas, un seul des noyaux pénètre dans le bourgeon comme nous l'avons montré précédemment, ce qui ne permet guère d'adopter cette dernière hypothèse. De ces trois interprétations, la première est de beaucoup la plus vraisemblable ; néanmoins nous n'essayerons pas de donner la préférence à l'une d'elles, la technique ne nous ayant pas permis d'obtenir de données suffisamment précises.

VII. — SACCHAROMYCES SATURNUS

Cette levure découverte tout récemment par Klöcker (6) présente de grandes analogies avec le *S. anomalus* par ses caractères physiologiques et par la forme spéciale de ses spores : ces dernières sont, en effet, ceintes extérieurement d'un anneau médian saillant qui leur donne un peu l'aspect de la planète Saturne, d'où le nom de *Saturnus* donné à cette espèce. On sait que les spores du *S. anomalus* ont aussi une forme particulière, celle d'un chapeau avec un filet saillant partant de la base. La germination des spores de *S. Saturnus* a été décrite par Klöcker (6), elle s'effectue, d'après lui, de la manière suivante : les spores se gonflent et leur anneau disparaît, puis elles bourgeonnent à la façon de cellules végétatives ; Klöcker rapproche ce mode de germination de celui qu'ont observé Hansen (1) et Barker (23) dans *S. anomalus*. Il signale quelques cas de fusion entre les spores. Nous avons suivi la germination des spores de cette levure ; les spores se gonflent, leur anneau disparaît peu à peu, puis elles commencent leur développement (fig. 7). Les cas de fusion sont un peu moins fréquents que dans la levure de Johannisberg ; il n'y a guère qu'un peu moins de la moitié des spores qui se fusionne ; dans ce cas, la fusion s'effectue exactement comme dans les levures précédentes, mais elle s'opère rarement entre des spores contiguës.

Les spores qui germent isolément bourgeonnent directement à la façon des cellules ordinaires; nous avons pris ici encore des figures résultant de fusions pour des tubes germinatifs dérivés de spores uniques et nous avons décrit, dans notre note préliminaire (17), un mode particulier de germination des spores : nous avons montré que les spores, qui germaient sans fusion préalable,

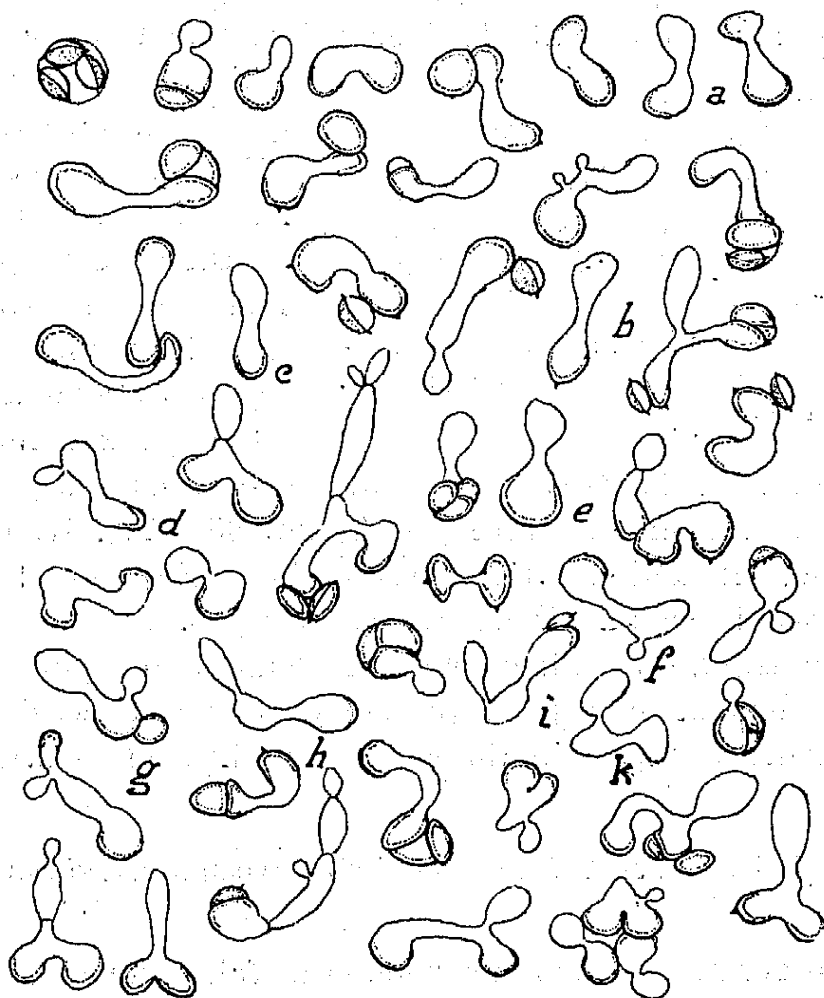


Fig. 7. — *Saccharomyces Saturnus*. — Germination des spores (tranche de carotte, après 10 heures); gross. environ 1000.

produisaient avant de bourgeonner des tubes de germination et nous avons rapproché ce mode de germination de celui de la levure de Johannisberg (fig. 7, a, b, c, d, e, f, g, k); nous avons fait remarquer, à propos de cette dernière levure, que cette interprétation était inexacte et il ne sera pas nécessaire d'y revenir ici.

Les cellules du *S. Saturnus* possèdent un très gros noyau avec

une structure très différenciée (Pl. 3, fig. 61 et 62). La division du noyau se fait quelquefois par étranglement (Pl. 3, fig. 64 bis) : cependant, elle paraît s'accomplir le plus souvent par karyokinèse ; on rencontre souvent, en effet, des figures d'anaphase avec deux petits pôles chromatiques reliés par un fuseau au milieu duquel se trouve le nucléole (Pl. 3, fig. 63, 64 et 74) ; ces figures rappellent tout à fait les karyokinèses que nous (11) avons signalées dans les *Pezizes* : elles méritent d'attirer spécialement notre attention,

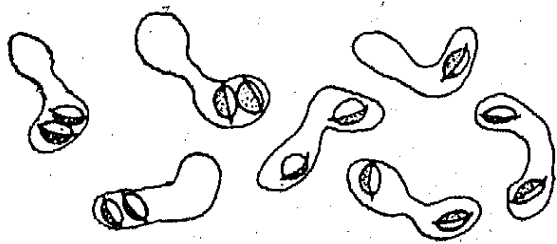


Fig. 8. — Spores copulées, transformées directement en asque (tranche de carotte) ; gross. environ 1000.

car c'est la première fois qu'on observe d'une manière précise des mitoses dans les levures.

On observe pendant la fusion des spores, comme dans les levures précédentes, des stades à deux petits noyaux dans le canal

de copulation et d'autres à un seul noyau plus gros, qui nous prouvent la fusion nucléaire (Pl. 3, fig. 65 à 74). La fusion des noyaux se fait toujours ici avant le bourgeonnement et on ne constate pas de cas où elle ne se produise pas.

Signalons, enfin, l'existence assez fréquente de spores transformées directement en asques, que nous avons eu l'occasion de rencontrer dans des germinations sur tranches de carotte (fig. 8).

VIII. CONJUGAISONS DES SCHIZOSACCHAROMYCÈTES

Les observations, que nous venons de faire sur la conjugaison des levures précédentes, nous ont donné sur la structure du noyau et sur fusion nucléaire, grâce à l'emploi d'une technique plus perfectionnée, des notions plus précises que celles que nous avons obtenues dans nos recherches antérieures sur les conjugaisons des *Schizosaccharomycètes* : nous avons donc été amené à reprendre l'étude de ces dernières ; il ne sera d'ailleurs pas inutile d'établir des comparaisons entre ces deux sortes de conjugaisons qui s'effectuent par le même procédé, mais à des stades différents. Nous reprendrons, pour la même occasion, les observations de

Barker sur le *Zygosaccharomyces*, lesquelles n'ont été confirmées encore par personne.

Dans le *Schizosaccharomyces octosporus*, nous avons suivi de nouveau la formation des asques en cultures sur cellules Van Tieghem. Nous n'aurons pas grand'chose à ajouter à ce que nous avons déjà dit sur la question. Si l'on place quelques spores sur du jus de raisin gélatiné dans une cellule Van Tieghem, on les voit se gonfler, puis, au bout de quelques heures, se cloisonner en plusieurs cellules. Il se produit ainsi une active multiplication qui dure deux jours. Vers le troisième jour, la multiplication se ralentit et la conjugaison commence.

Comme nous l'avons fait remarquer, les deux cellules qui se fusionnent pour former un asque sont très souvent issues d'une même génération; mais nos récentes observations, ayant porté sur un très grand nombre de cellules, nous ont montré cependant que

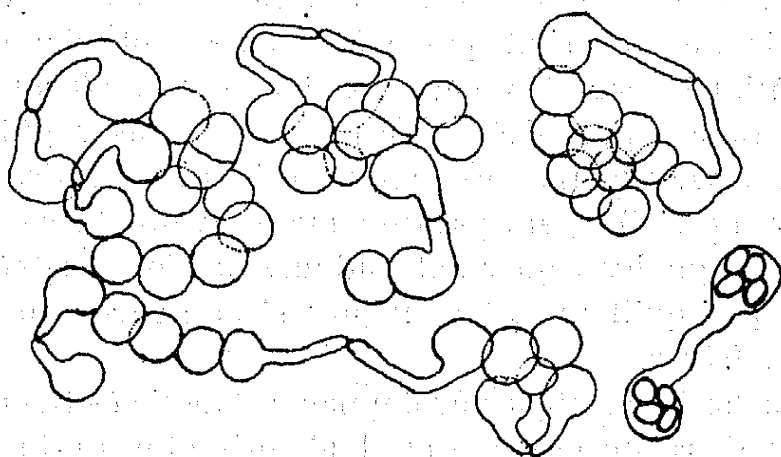


Fig. 9. — *Schizosaccharomyces octosporus*. — Conjugaisons dans une race tendant à devenir asporogène (Jus de raisin à 8 % de gélatine); gross. environ 1000.

nous avons été peut-être porté à exagérer la généralité de ce caractère: souvent, en effet, ce sont des cellules contiguës d'une longue file de cellules ou d'un amas muriforme de cellules qui s'unissent et il est impossible d'en définir la parenté exacte; dans quelques cas, nous avons constaté que deux cellules voisines et isolées s'unissaient et paraissaient provenir d'un même bipartition alors qu'elles étaient détachées de colonies différentes et se trouvaient accidentellement accolées l'une à l'autre. Enfin, comme nous l'avons fait ressortir, dans les cellules manifestant une tendance à devenir

asporogènes, les cellules sporogènes se trouvant souvent entourées de cellules asporogènes sont obligées de s'unir à d'autres cellules sporogènes qui sont plus ou moins éloignées d'elles et souvent de parenté éloignée (Fig. 9). Pour cela, elles doivent émettre de très longues protubérances qui souvent ne parviennent pas à s'unir et finissent par se cloisonner pour former des cellules végétatives; quand elles se fusionnent, elles donnent naissance à des asques formés de deux renflements unis par un long canal de copulation (Fig. 9); on pourra donc souvent reconnaître à la forme des asques si la conjugaison s'est produite entre des cellules contiguës ou entre des cellules éloignées. Dans le premier cas, la fusion aboutit généralement à des asques à formes ovales, alors que, dans le second, elle donne naissance à des asques qui conservent des traces de l'individualité de deux gamètes; cependant la longueur du canal de copulation, quand il ne dépasse pas une certaine mesure, n'indique pas nécessairement que les deux gamètes, qui se sont fusionnés, ne sont pas frères ou ne proviennent pas de cellules contiguës, car, de même que dans le *S. Ludwigi*, la fusion des protubérances peut s'effectuer plus ou moins rapidement; il peut se faire, par exemple, que les protubérances émises par deux cellules sœurs s'allongent parallèlement avant de se fusionner. Cela explique que les asques ont toujours des formes extrêmement variables. Quoi qu'il en soit la fusion s'établit très souvent entre des gamètes frères.

Sur tranche de carotte le développement ne s'effectue pas comme dans le jus de raisin gélatiné et il aboutit plus rapidement à la sporulation; si l'on ensemence sur ce milieu des spores et si l'on observe leur développement, en prélevant heure par heure une petite portion de la levure que l'on examine au microscope, on observe des phénomènes très curieux: la carotte étant un milieu défavorable au développement végétatif de la levure, les spores subissent un petit nombre de cloisonnements, pas plus de deux ou trois, puis les cellules nées de ce cloisonnement se fusionnent aussitôt pour former des asques; douze heures après l'ensemencement presque toutes les cellules sont en voie de fusion et quelques-unes d'entre elles ont déjà formé des spores; au bout de vingt-quatre heures toutes les cellules sont transformées en asques. Quelquefois même les spores, après s'être gonflées, se fusionnent,

sans avoir subi aucune division, avec des cellules provenant du cloisonnement d'une spore voisine ou même avec d'autres spores du même asque ou d'asques différents, pour donner naissance à de nouveaux asques. C'est ainsi que l'on rencontre des spores qui se fusionnent dans l'intérieur même de la membrane de l'asque qui ne s'est pas encore résorbée (fig. 10). On peut donc rencontrer, par suite d'un raccourcissement du développement, des fusions de spores analogues à celles que l'on constate normalement dans le

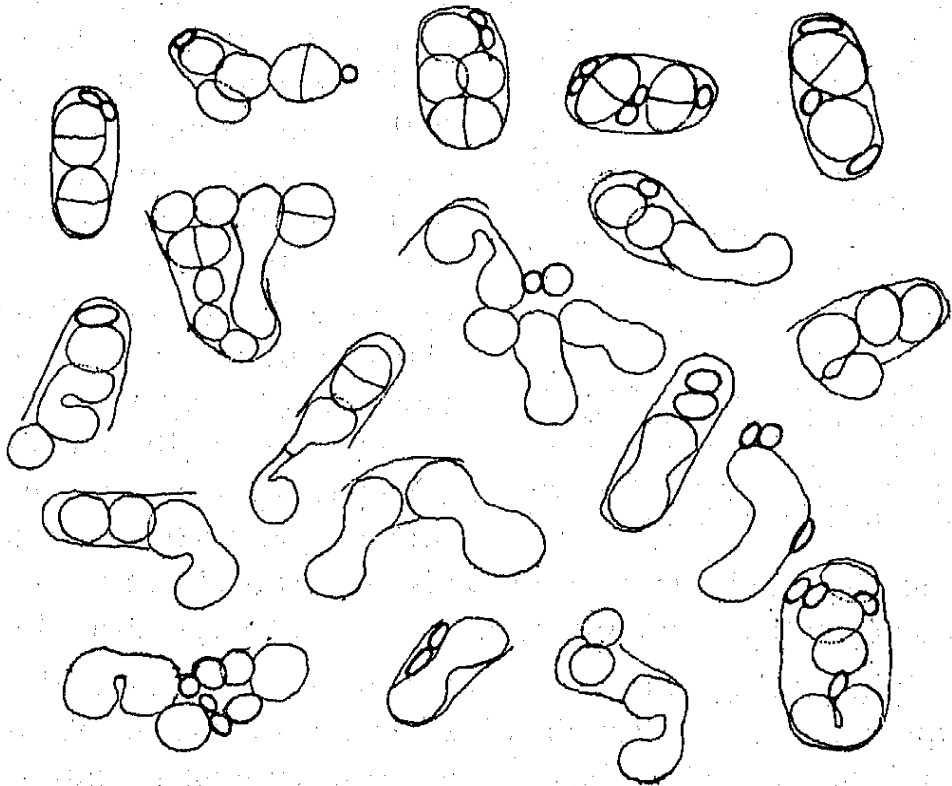


Fig. 10. — *Schizosaccharomyces octosporus*. — Tranche de carotte; spores se transformant directement en asques.

S. Ludwigii, mais, tandis que dans ce dernier, elles aboutissent à la formation de cellules végétatives, dans le *Sch. octosporus*, elles produisent de nouveaux asques. Hansen (5) (1902), avait déjà signalé un fait analogue dans la levure de Johannisberg : il avait montré récemment que les spores de cette levure, placées pendant quelques heures dans un liquide très nutritif, puis transportées sur bloc de plâtre, se transforment directement en asque sans multiplication préalable. A peu près à la même époque et indépendamment de lui, nous (2) avons observé le même phénomène dans le

S. Ludwigii : nous avons montré que les spores germant sur tranche de carotte peuvent parfois, après s'être fusionnées, produire directement des spores; dans ce cas, l'asque est formé de deux cellules réunies par un canal de copulation et ressemble à un asque de Schizosaccharomycète (fig. 11). Par un raccourcissement du développement, on obtient donc dans le *S. Ludwigii*, une formation d'asque précédée d'une conjugaison. Nous avons signalé

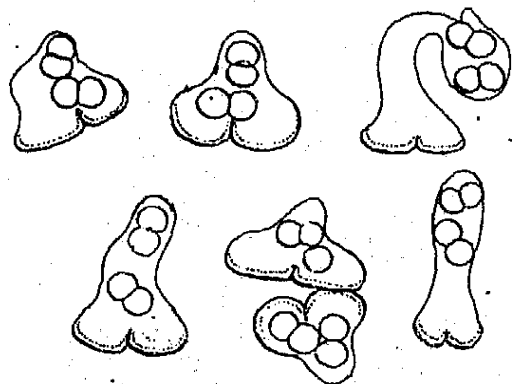


Fig. 11. — *Saccharomyces Ludwigii*.— Germination des spores sur tranche de carotte; spores se transformant directement en asques après leurs fusions. Gross. environ 1000.

précédemment le même phénomène, dans la levure de Johannisberg et dans le *S. Saturnus*.

Nous avons obtenu de très belles colorations nucléaires à l'aide de fixations au microformol. Nous (4) avons figuré autrefois le noyau du *Sch. octosporus* avec un nucléole entouré d'une zone claire; dans nos nouvelles préparations, le noyau montre une structure plus différenciée : nucléohyaloplasme entouré d'une membrane, nucléole et quelques

fins granules de chromatine. La division paraît s'effectuer dans les cellules végétatives par amitose (allongement suivi d'étranglement).

Les phénomènes de fusions nucléaires sont très analogues à ceux que nous avons décrit dans les fusions de spores du *S. Ludwigii* et de la levure de Johannisberg : le noyau se montre indépendant du cytoplasme et ne pénètre ordinairement dans le canal de copulation que lorsque la cloison séparatrice des deux cellules est résorbée. La fusion nucléaire se manifeste par des stades à deux noyaux très rapprochés l'un de l'autre dans le canal de copulation et par des stades à un seul noyau, le plus souvent au milieu du canal de copulation, parfois dans l'un des gamètes. (Pl. 4, fig. 1 à 22). Dans les stades à un seul noyau, ce dernier présente souvent une forme allongée indiquant que la fusion n'est pas achevée. (Pl. 4, fig. 15).

Les spores naissent ordinairement à un endroit quelconque de l'œuf; dans le cas où les deux gamètes conservent leur indivi-

dualité, elles se forment souvent par groupe de quatre dans les deux renflements. Il nous est impossible de savoir par quel mode s'effectuent les divisions nucléaires qui précèdent la formation des spores (Pl. 4, fig. 22 à 25); cependant elles ne paraissent pas se faire par amitose; on rencontre même certaines figures qui ressemblent un peu à des karyokinèses (Pl. 4, fig. 23).

On sait que le *Schizosacharomyces Pombe* et le *Schizosaccharomyces mellacei* sont des espèces très voisines du *Sch. octosporus*, dont la conjugaison et la formation des asques présentent les mêmes caractères.

Dans ces deux espèces, les spores germant sur tranche de carotte se développent normalement, mais, comme chez le *Sch. octosporus*, elles ne fournissent qu'un très petit nombre de cellules végétatives qui ne tardent pas à se conjuguer: au bout de 24 heures toutes les cellules sporogènes sont transformées en asques. Jamais, cependant, nous n'avons constaté de fusions s'opérant entre les spores. Il serait possible, toutefois, qu'il s'en produisît comme dans le *Sch. octosporus*, ce qui expliquerait les résultats de Lepeschkin: cet auteur aurait pu les observer, sans s'apercevoir qu'elles aboutissaient directement (7) à la formation d'un nouvel asque. Cependant parmi les quelques dessins, d'ailleurs assez peu significatifs, qu'il donne de ces fusions, dans deux ou trois figures, il représente un tube de germination au milieu de ce qu'il considère comme deux spores fusionnées, ce qui indique formellement qu'il s'est trompé dans son interprétation, ainsi que nous l'avons indiqué au début de cet article.

Les *Sch. Pombe* et *mellacei* renferment aussi un noyau avec une structure différenciée où l'on distingue nucléohyaloplasme et nucléole: la chromatine est très abondante et se présente sous forme d'un réseau assez net. La fusion nucléaire s'accomplit de la même façon que dans le *Sch. octosporus*, comme l'indique les figures 26 à 38 de la Pl. 4. On observe un certain nombre de figures à un seul noyau allongé dans le canal de copulation; il est difficile de savoir si l'allongement de ce noyau est dû à la fusion nucléaire ou à la première division du noyau copulé.

IX. — CONJUGAISON DU ZYGOSACCHAROMYCES

Le *Zygosaccharomyces* offre une conjugaison absolument identique à celle des *Sch. Pombe* et *mellacei*. Mais, dans le *Zygosaccharomyces*, il n'est pas possible de définir la parenté des gamètes, la multiplication de cette levure s'effectuant par bourgeonnement. Les phénomènes cytologiques présentent aussi les mêmes caractères, mais les colorations sont beaucoup plus difficiles que dans les Schizosaccharomycètes, ce qui explique que Barker ait hésité à se prononcer définitivement sur la fusion nucléaire. Les deux gamètes montrent chacun un noyau à structure différenciée : les deux noyaux se fusionnent toujours dans l'un des gamètes et jamais dans le canal de copulation, par suite de l'extrême minceur de ce dernier (Pl. 4, fig. 39 à 43). Les figures que nous donnons correspondent à celles que représentent Barker dans son mémoire (On the spore formation among the Saccharomyces (13). Journal of the Federated Institutes of Brewing, p. 57, Plate IV), où il semble bien avoir figuré le noyau. Dans les dessins qu'il a publié dans son premier mémoire (A conjugating Yeast. (23) Philosophical transaction of the Royal Society of London (fig. 10, 3 et 22), ce qu'il représente comme un noyau paraît plutôt correspondre au cytoplasme, qui, très dense et très colorable, s'accumule dans le canal de copulation et autour du noyau. Les gamètes renferment, outre le noyau, un grand nombre de corpuscules métachromatiques, qui restent localisés dans les deux renflements, une fois la fusion opérée, et qui, plus tard, sont absorbés par les spores.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

La fusion nucléaire, ayant été constatée de la manière la plus précise, dans la fusion des spores de *S. Ludwigii* et de la levure de Johannisberg, ne peut faire aucun doute et l'on est forcé de considérer ces phénomènes de fusion comme des conjugaisons isogamiques, au même titre que celles que l'on observe dans les

Schizosaccharomycètes et dans le *Zygosaccharomyces*, au moment de la formation des asques. On doit donc admettre que certaines levures (les Schizosaccharomycètes et le *Zygosaccharomyces*) présentent des conjugaisons isogamiques avant la formation des asques, ce qui concorde avec ce que l'on sait de la reproduction sexuelle des Ascomycètes auxquels on doit rattacher les levures ; tandis que dans d'autres espèces, cette conjugaison se trouve reportée à un autre stade du développement, au moment de la germination des spores : c'est le cas du *S. Ludwigii*, de la levure de Johannisberg et du *S. Saturnus*, que nous venons d'étudier. Il y a pour ces deux groupes de levures un développement très différent ; dans les Schizosaccharomycètes et le *Zygosaccharomyces*, le tronçon sexué est prédominant dans le développement, et le tronçon asexué très réduit, tandis que, dans le *S. Ludwigii*, la levure de Johannisberg et le *S. Saturnus* on constate le contraire.

La conjugaison s'opère d'ailleurs dans les deux cas d'une manière absolument identique. Cette variation dans le cycle évolutif d'espèces appartenant à une même famille et à des genres considérés comme très voisins constitue évidemment un fait inattendu et anormal au point de vue biologique ; les phénomènes de fécondation s'opèrent d'ordinaire pour un groupe à un même stade du développement. Jusqu'ici, on ne connaît que deux cas qui fassent exception à cette règle et qui puissent, dans une certaine mesure, être comparés à ce que nous venons d'observer dans les levures. Dans les végétaux, le cas des Muscinées et des Cryptogames vasculaires et dans les animaux celui des Coccidies et des Grégarines. Les Muscinées et les Cryptogames vasculaires présentent, en effet, une évolution inverse bien que représentée par des stades homologues, mais ce sont là deux groupes de plantes très différents qui constituent deux embranchements.

Le cas des Coccidies et des Grégarines est beaucoup plus rapproché de celui des levures, car ces deux groupes de Sporozoaires sont extrêmement voisins et l'on éprouve beaucoup de difficultés à les séparer. Les divers stades de leur cycle évolutif sont facilement homologuables. Dans les Coccidies, certaines cellules donnent naissance à un grand nombre de microgamètes pendant que d'autres se transforment en un seul macrogamète. La fécondation effectuée entre un microgamète et un macrogamète, l'œuf s'enkyste

(ookyste) et produit des spores (sporoblastes) qui se transforment en sporocystes par la formation à l'intérieur de chacune d'elles de nouvelles spores (sporozoïtes). Dans les Grégarines, on constate un enkystement de deux individus adultes ; ceux-ci forment des sporoblastes et ce sont ces derniers qui jouent le rôle de gamètes et qui se fusionnent entre eux pour donner des sporocystes. La conjugaison ne se fait donc pas au même stade dans ces deux groupes ; dans les Coccidies, elle s'opère avant la formation des sporoblastes, alors qu'elles s'effectuent dans les Grégarines entre les sporoblastes.

Une autre question se pose ici : les fusions cellulaires accompagnées de fusions nucléaires que nous avons constatées dans les levures peuvent-elles véritablement être considérées comme des conjugaisons ? répondent-elles à la définition de la conjugaison ? On entend généralement par conjugaison la fusion de deux gamètes cytoplasme à cytoplasme, noyau à noyau : l'on distingue le cas de la conjugaison isogamique du cas des anastomoses fréquentes chez les Champignons et des unions plasmodiales de certains Protozoaires uniquement par le fait que, dans la conjugaison, il y a fusion nucléaire, tandis que, dans les autres cas, il n'y a que fusion cellulaire. Jusqu'ici on ne connaît aucun exemple de fusion cellulaire accompagnée de fusion nucléaire qui n'ait pas été considéré comme une conjugaison.

Van Tieghem (24) cependant, dans son *Traité de Botanique*, donne la définition suivante de la conjugaison : « C'est la combinaison de deux gamètes, protoplasme à protoplasme, noyau à noyau. Le produit de cette combinaison est une cellule nouvelle qu'on appelle un œuf. Qu'il y ait réellement dans l'œuf combinaison et non simple mélange des gamètes, c'est ce que démontre suffisamment la contraction progressive qui s'opère toujours pendant la fusion d'où résulte que le volume de l'œuf est toujours moindre que la somme de ses composants ». On admet généralement aussi, depuis les expériences de Maupas sur les Infusoires, que ce sont des gamètes provenant de générations très éloignées qui s'unissent et qui apportent par conséquent des caractères héréditaires dissemblables.

Les conjugaisons des spores des levures aussi bien que celles qui aboutissent à la formation de l'asque chez le *Zygosaccharomyces* et les *Schizosaccharomycètes* ne répondent donc pas entièrement à

cette définition : en effet, la fusion n'est pas totale et les gamètes restent individualisés ; l'œuf provenant de ces conjugaisons n'est donc pas de volume inférieur à celui de la somme des volumes de ses composants ; de plus, dans la plupart des cas, les deux gamètes qui s'unissent proviennent d'une même génération ou de générations très rapprochées. Mais en réalité un grand nombre de recherches récentes sur la conjugaison des Protistes nous ont montré que le seul caractère essentiel de la conjugaison est la fusion nucléaire et il semble que tous les autres n'aient qu'une importance très relative.

La conjugaison du *Zygosaccharomyces* et des Schizosaccharomycètes peut, en effet, être comparée aux échanges karyogamiques des Infusoires. Dans ces organismes, la conjugaison consiste en l'accolement de deux cellules épuisées qui se fusionnent par un petit canal : leurs noyaux échangent une partie de leur substance, après quoi les deux cellules se séparent et se multiplient chacune isolément. Dans le *Zygosaccharomyces* et les Schizosaccharomycètes, on constate l'accolement de deux cellules par un canal de copulation et une fusion nucléaire au milieu de ce canal ; puis le noyau résultant de cette fusion se divise immédiatement en deux noyaux fils qui émigrent chacun dans l'une des deux cellules, lesquelles ont conservé leur individualité, et qui y subissent ordinairement une deuxième division pour former quatre spores, deux dans chaque cellule. Les gamètes paraissent conserver leur indépendance et la seule différence essentielle, qui existe entre cette conjugaison et les échanges karyogamiques des Infusoires, consiste en ce que les deux gamètes restent réunis après la fusion nucléaire par le canal de copulation. Dans le *Sch. octosporus*, les choses se passent autrement : il existe une tendance manifeste à la production d'un véritable œuf, puisque souvent les deux gamètes présentent une fusion totale et que la formation des spores s'effectue généralement à un endroit quelconque de l'œuf, mais dans ce cas l'œuf a toujours un volume égal à celui de ses composants.

Quant aux fusions des spores des *S. Ludwigi* et *Saturnus* et de la levure de Johannisberg, elles se produisent de la même façon que les conjugaisons du *Zygosaccharomyces*, mais ici on peut considérer comme un véritable œuf la masse protoplasmique uninucléée qui est rassemblée dans le canal de copulation : elle contient le

cytoplasme et le noyau de la cellule nouvelle et elle est le siège de la multiplication, les deux spores restant ordinairement inactives.

Pour ce qui concerne la parenté des gamètes, on a vu que, dans les Schizosaccharomycètes, les gamètes sont très souvent issus d'une même génération ou de générations très rapprochées, sauf quand les cellules manifestent une tendance à devenir asporogènes; entremêlées de cellules asporogènes, elles sont alors obligées de chercher plus ou moins loin un autre gamète pour se fusionner avec lui. Il en est de même pour le *S. Ludwigii* : ce sont les spores contiguës et sœurs qui se copulent, sauf dans les germinations de spores âgées où, un certain nombre d'entre elles étant mortes, la fusion ne peut se produire souvent qu'entre des gamètes de parenté éloignée. Enfin, dans la levure de Johannisberg et dans le *S. Saturnus*, la conjugaison s'effectue très fréquemment entre des gamètes de parenté éloignée, probablement par suite du nombre variable des spores contenues dans un asque, lequel n'étant pas toujours un nombre pair, rend souvent cette conjugaison impossible entre les spores d'un même asque.

On voit donc, qu'en définitive, un gamète s'unit toujours au gamète le plus voisin et que la conjugaison paraît suivre la *loi du moindre effort*. Au moment où nous avons publié nos premiers résultats sur cette question, la conjugaison de l'*Actinosphaerium*, étudiée par R. Hertwig (25) était un des seuls exemples de conjugaison s'effectuant régulièrement entre éléments d'une même génération. Depuis, de nombreuses recherches, faites dans cet ordre d'idées, en ont multiplié les exemples. Schaudinn (26) a observé des phénomènes analogues dans certaines Bactéries (*Bacillus Bütschlii* et *Bacillus Sporonema*) et Löwenthal (27) dans le *Basidiobolus lacertæ*. Les (28) travaux relatifs aux cycles évolutifs des Protozoaires ont mis en évidence également des phénomènes de cet ordre que les auteurs allemands ont désigné sous le nom d'*autogamie*, et entre autres Schaudinn dans l'*Entamoeba coli*, le *Bodo lacertæ* et le *Trichomastix lacertæ*. Certains ookinètes à caractère femelle des Hématozoaires étudiés par Schaudinn peuvent après leur transformation en Trypanosomes présenter des phénomènes analogues. Peut être même ces conjugaisons entre éléments frères ou très proches parents sont-elles beaucoup plus répandues qu'on ne le croit chez les microorganismes. Dans beaucoup d'Algues, les œufs peu-

vent provenir de la fusion de gamètes contigus (*Spirogyra*, etc.) : il est difficile de savoir quelle parenté les relie, mais il ne serait pas impossible qu'ils provinssent d'une même génération.

Quelques auteurs (28) ont rapproché ces phénomènes d'autogamie de certains cas bien connus de parthénogénèse chez les métazoaires, par exemple, celui de l'*Artemia salina* (23), étudié par Brauer, où le second globule polaire se fusionne, peu de temps après sa formation, avec l'œuf et joue le rôle de pronucleus mâle. Remarquons que dans les levures, les gamètes ne sont pas nécessairement frères, ni proches parents ; ils proviennent dans beaucoup de cas de générations très éloignées, ce qui ne semble pas permettre de rapprocher leur conjugaison de ces cas de parthénogénèses et qui leur donne bien le caractère d'une fécondation. Il est possible néanmoins que ces cas de sexualité rudimentaire soient des phénomènes dégénératifs et non des phénomènes primitifs comme on aurait pu le croire au premier abord. Quoiqu'il en soit, on doit admettre que les phénomènes dont nous venons de parler chez les levures sont bien homologues des conjugaisons isogamiques, puisqu'ils présentent le seul caractère essentiel de la conjugaison, c'est-à-dire la fusion nucléaire : il est impossible d'après les idées actuellement admises, de ne pas les considérer comme des conjugaisons véritables.

Il faut admettre que la conjugaison, qui a lieu, chez les Schizosaccharomycètes et les *Zygosaccharomyces*, au moment de la formation des asques, se trouve reportée, chez un certain nombre de levures, au moment de la germination des spores. Dans les deux cas, d'ailleurs, la conjugaison s'effectue de la même manière. Les cas de fusion sont moins nombreux dans la levure de Johannisberg et dans le *S. Saturnus* ; ces deux levures montrent donc une tendance manifeste à l'apogamie. En outre, dans la levure de Johannisberg, on constate des anomalies très intéressantes : un certain nombre de cellules fusionnées paraissent ne pas subir la fusion nucléaire et cette fusion, lorsqu'elle a lieu, s'effectue parfois seulement après l'apparition du premier bourgeon ; ce sont des particularités très curieuses qu'il est difficile d'interpréter d'une manière précise pour le moment.

Ce travail a été terminé au laboratoire de Botanique de l'École

normale supérieure et nous tenons à exprimer tous nos remerciements à M. le professeur Matruchot qui a bien voulu examiner nos préparations et nous aider de ses conseils (1).

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. HANSEN. — *Sur la germination des Saccharomyces* (Comptes-rendus des travaux du laboratoire de Carlsberg. 30 vol., 1^{re} livr. 1891).
2. GUILLIERMOND. — *Rech. sur la germination des spores du S. Ludwigii* (Bull. de la Soc. Mycol. de France, t. XIX, 1^{er} fasc., 1903).
3. BARKER. — *A conjugating Yeast* (Proceeding of the Royal Society).
4. GUILLIERMOND. — *Rech. sur la sporulation des Schizosaccharomyces* (C. R. de l'Ac. des Sciences, 22 juillet 1901). — *Rech. cytologiques sur les levures*. Storck, éditeur, Lyon, 1902. Résumé dans la Revue génér. de Botanique. 1903).
5. HANSEN. — *La spore devenue sporange* (C. R. du Lab. de Carlsberg 1902).
6. KLÖCKER. — *Une espèce nouvelle de Saccharomyces, S. Saturnus* (C. R. du Lab. de Carlsberg, 6^e vol., 2^e livr., 1903).
7. LEPESCHKIN. — *La connaissance de l'hérédité chez les organismes unicellulaires* (Centr. für Bactériologie, 1903).
8. FEDERLEY. — *Die copulation der Conidien bei Ustilago Tragopogi pratensis* (Opversigt of Finska Kteuskap Socédentens Förhandlingar. XI, VI, 1903-1904. Résumé dans le Bot. Zeitung, 1904).
9. J. MASSART. — *Alimentation, sexualité et mort chez les organismes inférieurs* (Annales de la Société des Sciences médicales et naturelles de Bruxelles, 1904).
10. M^{lle} POPTA. — *Beit. zur Kenntnis der Hemiasci* (Flora, 1899).
11. GUILLIERMOND. — *Rech. sur l'épiplasme des Ascomycètes* (Revue générale de botanique, 1904).
12. GUILLIERMOND. — *Considérations sur la sexualité des levures* (C. R. de l'Ac. des Sciences, 23 déc. 1901).
13. BARKER. — *On the formation among the Saccharomyces* (Journal of the Feder. Inst. of Brewing, vol. VI, II, 1902).
14. WORTMANN. — *Landiv. Jalvib.*, 1892.
16. GUILLIERMOND. — *Recherches sur la germination des spores chez les levures*, (C. R. Ac. des Sciences, décembre 1904).

(1) Nous remercions aussi M. Mesnil, de l'Institut Pasteur, ainsi que MM. Varney et Conte (du Laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences de Lyon), qui nous ont fourni les éléments nécessaires pour nos comparaisons avec les Protozoaires.

17. MAIRE. — *Rech. cyt. sur les Basidiomycètes* (Bull. de la Soc. mycol. de France, 1902).
18. CHODAT et CRETIER. — *Influence du noyau pour la production des ramifications chez les Algues* (Archiv. des Sciences physiques et naturelles, XIII, Genève).
19. KLEBHAN. — Archiv. für Protistenkunde, 1902.
20. SAUVAGEAU. — *Les Cutleriées et leur alternance de génération* (Ann. des Sciences nat. Bot., 1899).
21. GUILLIERMOND. — *Remarques sur la copulation du Sch. mellacei* (Bull. de la Société botanique de Lyon, 1903).
22. PRENANT, BOUIN et MAILLARD. — *Traité d'Histologie*, t. I; *Cytologie générale*, t. I, Schleicher et C^{ie}, éditeurs (pages 893, 914, 915).
23. BARKER. — *A. Fragrant Mycoderma Yeast S. anomalus* (Ann. of Botany, vol. XIV, n° LIV, 1900). *A. conj. Yeast* (Philosophical Transaction of the Royal Society of London, vol. 194, 1901).
24. VAN TIEGHEM. — *Traité de Botanique*, p. 26.
25. R. HERTWIG. — *Kernth Richtung und Befruch von Actinosphærium* (Abh. K. Bayer Akad. wiss., XIX, 2).
26. SCHAUDINN. — *Beit. zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen* (Archives für P. Protistenkunde, Bd. II, 1903) *Beit. zur Kennt. der Bakterien* (Archives f. Protistenkunde, Bd I, 1902, p. 306).
27. LÖWENTHAL. — *Beit. zur Kennt. des Basidiobolus lacertae* (Arch. Protistenkunde, Bd. II, 1903).
28. CAULLERY et MESNIL. — *Revue annuelle de Zoologie* (Revue générale des Sciences, 30 juin 1904).

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 6.

Saccharomyces Ludwigii. — Fixation au liquide de Péreniy, sauf la fig. 39 fixée au Flemming, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 1. — Cellules végétatives.

Fig. 2 à 41. — Fusions des spores et formation du promycélium. — 11, 14 et 15, stades de fusion nucléaire; 27, fusion entre deux spores appartenant chacune à un asque différent.

PLANCHE 7.

Levure de Johannisberg II. — Fixation au Péreniy, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 1 à 3. — Cellules végétatives; 3, division du noyau. —

Fig. 4 à 6. — Spores isolées formant chacune un bec destiné à la copulation.

Fig. 7 à 87. — Fusions des spores; 48 à 79, stades de fusion nucléaire, 56, 61, 74, 81, 82, stades de conjugaison effectuée à l'intérieur de l'asque à un seul noyau, 33, 34 à 38, 40, 41, bourgeonnement de la zygospore précédant la fusion nucléaire..

PLANCHE 8.

Levure de Johannisberg (de 1 à 60).

Fixation au Péreniy, coloration à l'hématoxyline ferrique, sauf la fig. 38.

Fig. 1 à 29. — Fusion des spores, les noyaux sont fusionnés.

Fig. 31 à 36. — Divisions nucléaires.

Fig. 37. — Fusions de deux spores dont l'une a commencé à germer isolément.

Fig. 38. — Fixation au picroformol et coloration à l'hémalun. — Noyau et corpuscules métachromatiques dans les vacuoles.

Fig. 39 à 50. — Fusions de spores n'étant pas accompagnées de fusions nucléaires (?).

Fig. 51 à 60. — Spores germant isolément.

Saccharomyces Saturnus (61 à 74) — Fixation au picroformol, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 61 à 64. — Cellules végétatives. — 63, anaphase de mitose. — 64 bis, amitose.

Fig. 64. — Spore germant isolément: le noyau se divise par mitose.

Fig. 65 à 74. — Fusions des spores. — 74 Division du noyau par mitose.

PLANCHE 9.

Schizosaccharomyces octosporus (1 à 25). — Fixation au picroformol, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 1 à 23. — Stades de la conjugaison. — 15 stade de fusion nucléaire.

Fig. 23 à 25. — Divisions nucléaires précédant la formation des spores.

23. — Karyokinèse ?

Schizosaccharomyces mellacei (26 à 38). — Fixation au Péreniy, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 26 et 27. — Cellules végétatives.

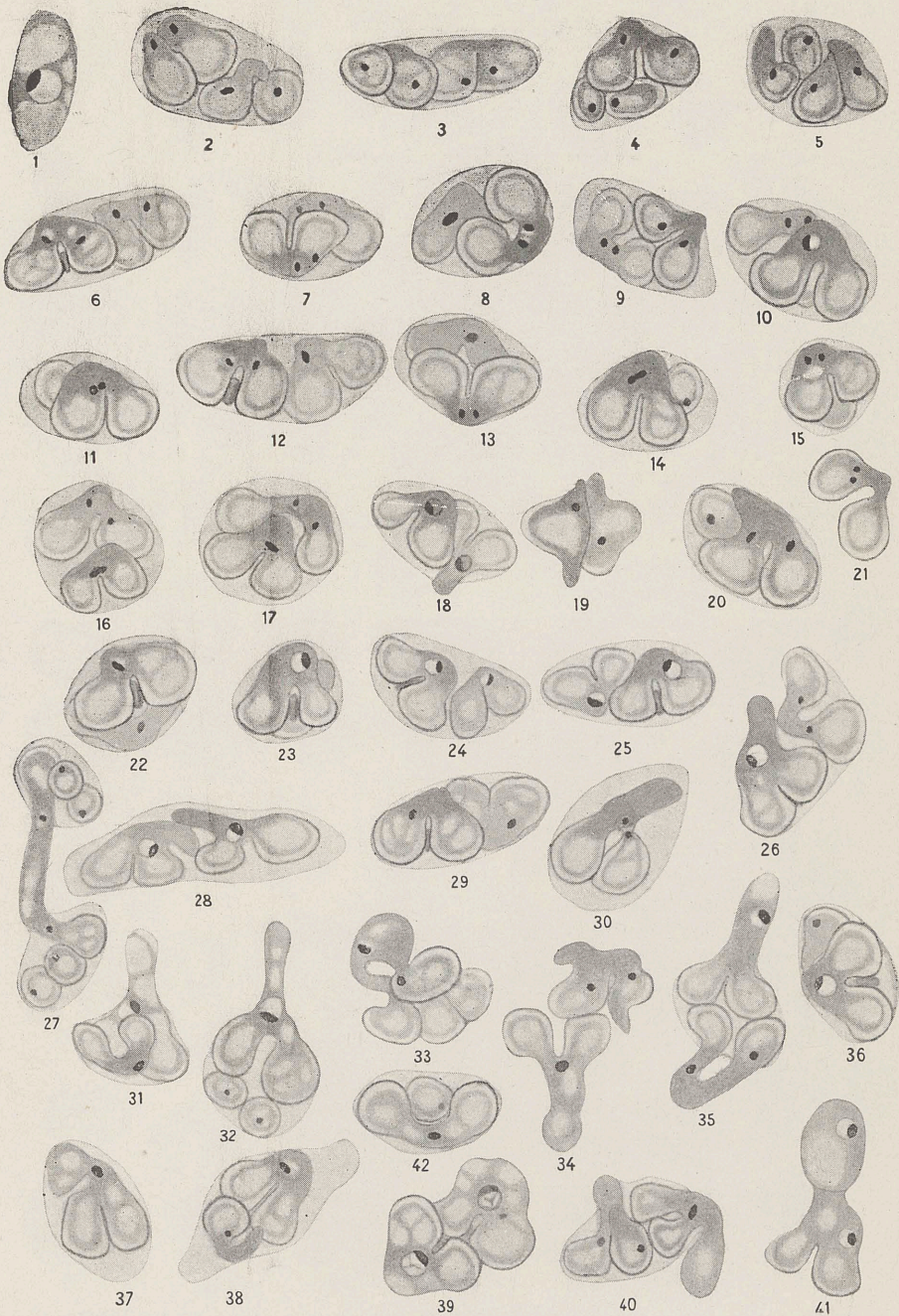
Fig. 28 à 38. — Conjugaisons. — 32, 35 et 36 stades de fusions nucléaires ?

Zygosaccharomyces (39 à 43). — Fixation au Péreniy, coloration à l'hématoxyline ferrique.

Fig. 39 à 41. — Conjugaisons.

Fig. 42. — Formation des spores.

Fig. 43. — Asque.

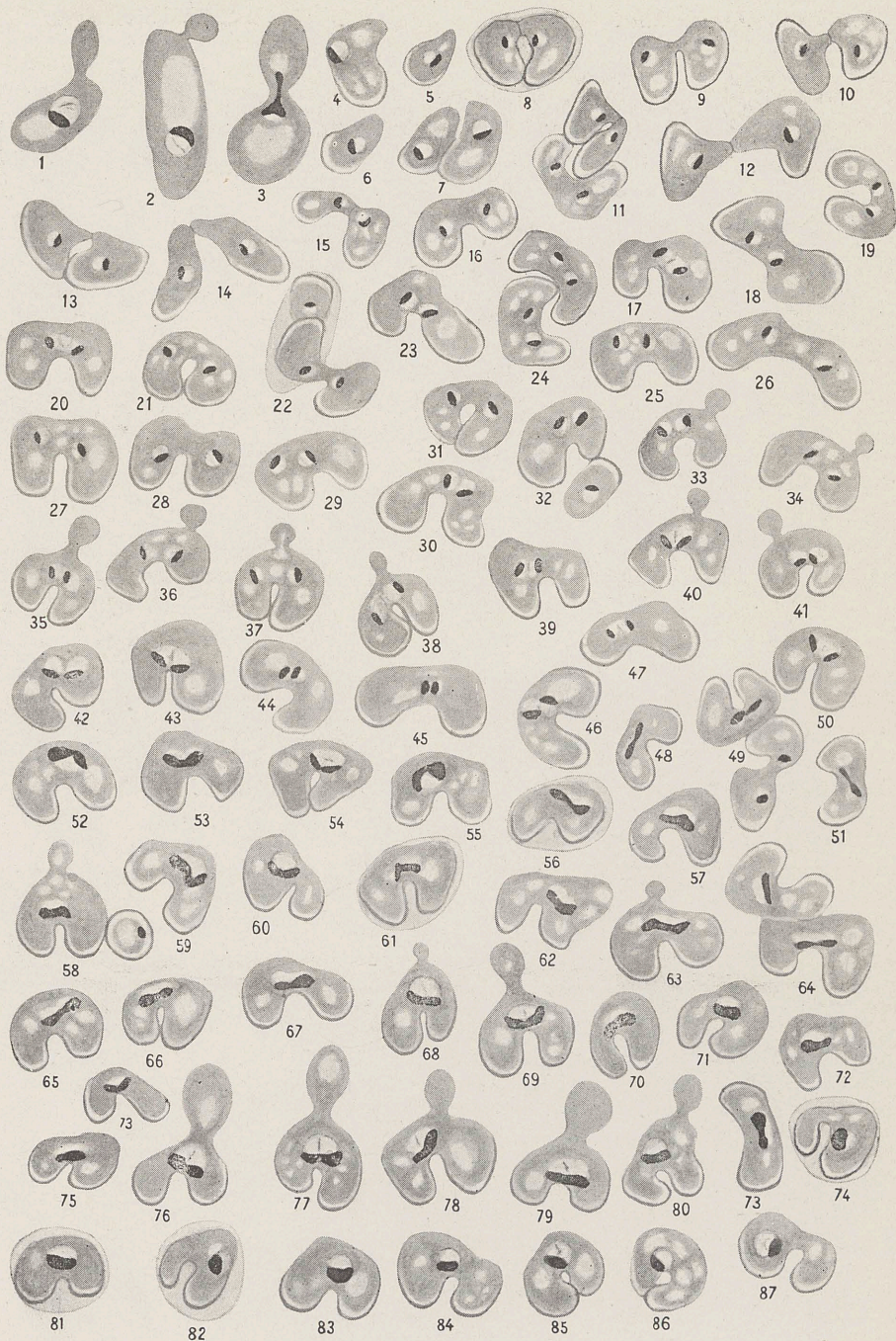


Guilliermond del.

Imp. Le Bigot Frères.

Bertin sc.

Saccharomyces Ludwigii.

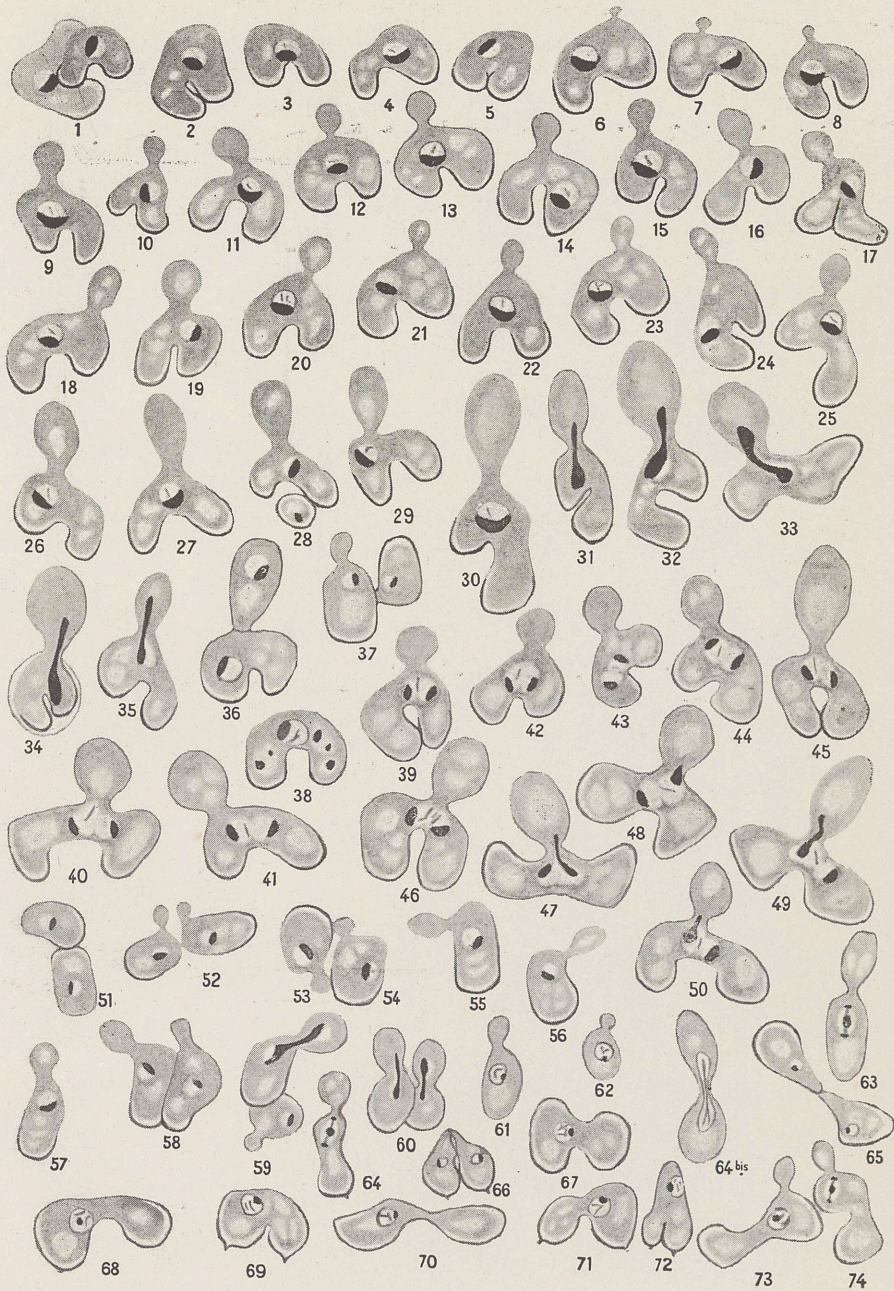


Guilliermond del.

Imp. Le Bigot Frères.

Bertin sc.

Levure de Johannisberg II.

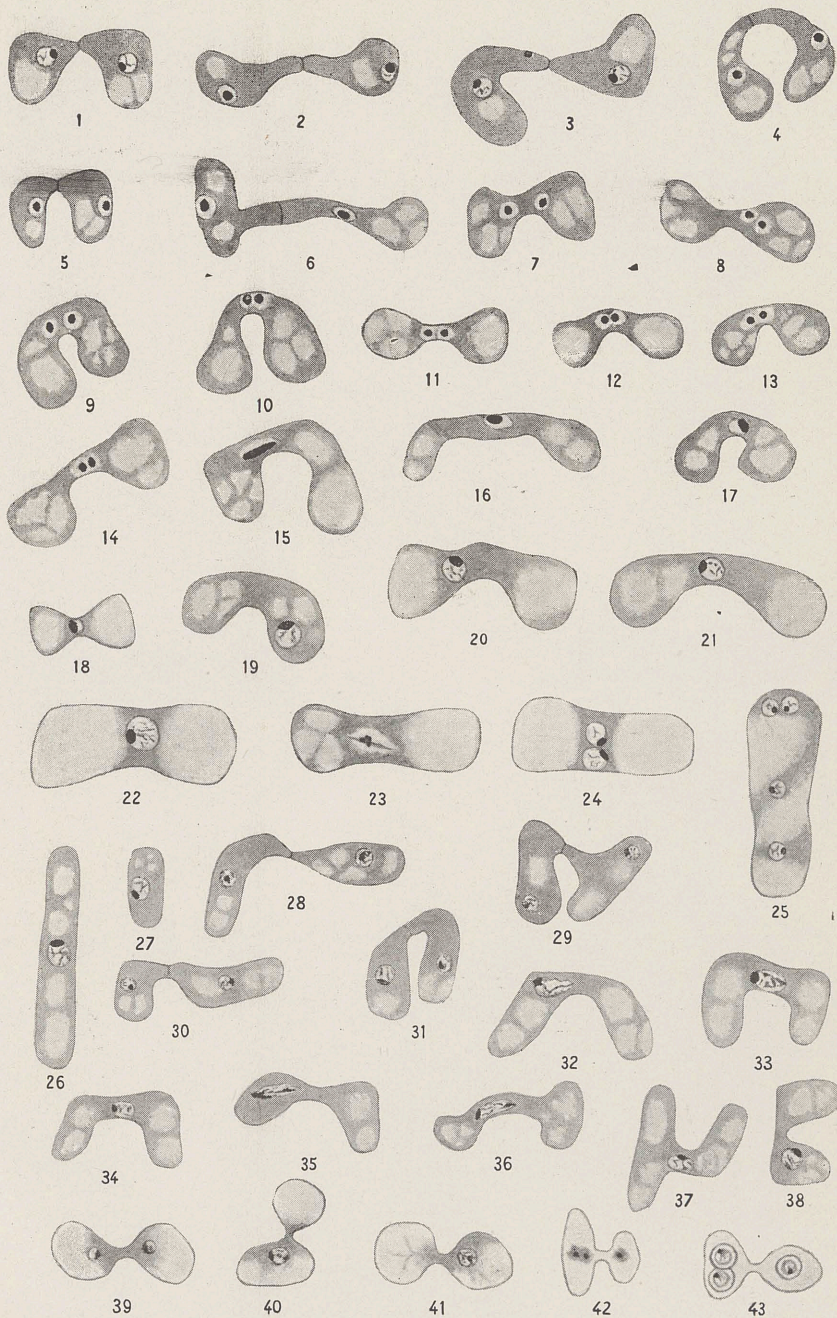


Guilliermond del.

Imp. Le Bigot Frères.

Berlin sc.

Levure de Johannisberg II et *Saccharomyces Saturnus*.



Guilliermond del.

Imp. Le Bigot Frères.

Bertin sc.

Sch. octosporus, *Sch. mellacei* et *Zygosaccharomyces*.