

# Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces blakesleeanus*

Autor(en): **Schopfer, W.-H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **41 (1932)**

Heft 1

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-27744>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces blakesleeanus*.

### Influence des substances vitaminiques (suite).

Par *W.-H. Schopfer*, Privat-docent à l'Université de Genève.

Manuscrit reçu le 18 janvier 1932.

### 5. Essai de purification du maltose.

Nous avons utilisé diverses méthodes de purification, chimiques ou physiques, afin d'obtenir un maltose pur à partir d'un échantillon doué de propriétés spéciales, ainsi que dans le but de séparer l'impureté supposée active.

#### Purification par ultrafiltration.

Dans les expériences de cette série, nous avons essayé de soumettre le maltose de Kahlbaum à l'ultrafiltration<sup>1</sup> afin d'observer si de ce fait, il perd de son activité particulière.

#### *a) Développement végétatif.*

Ultrafiltre filtrant 100 cc. d'eau en 3 heures, imperméable aux albumines et au rouge congo.

Milieu de Coons ordinaire.

Erlenmayer en verre d'Jéna de 100 cc. avec 12,5 cc. de milieu.

Stérilisation:  $\frac{15 \text{ minutes}}{115^\circ}$ .

Température: 18°; lumière ordinaire du jour.

Souches 46 (+), 48 (—) Burgeff, âgées de 5 jours.

	Maltose ordinaire non filtré		Maltose ordinaire filtré		Maltose pur de Schuchardt	
	(+)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—)
pois (mgr.) . . .	25	21	27,5	23	8,8	7,8
émersion . . . .	faible	moyenne	moyenne	forte	faible	faible
couleur de myc. .	jaune	gris	jaune pâle	gris	grisâtre — pas de différence de teinte	

Pas de différence entre les maltoses ordinaires non filtrés et filtrés. Il y a toujours un rapport de 3 à 4 entre les résultats fournis par le maltose ordinaire et le maltose chimiquement pur cristallisé.

<sup>1</sup> Filtres de la fabrique Membranfilter Gesellschaft, de Göttingen.

*b) Formation des zygotes.*

Cette expérience est faite avec cinq filtres de perméabilité décroissante :

1.	Retenant les colloïdes fins (sols d'or grossiers) . . . . .	45 sec.
2.	idem. (sols d'or fins) . . . . .	4 min.
3.	Retenant les colloïdes les plus fins (sols d'or fins) . . . . .	20 min.
4.	idem. idem. . . . .	40 min.
5.	idem. (imperméable au rouge congo et aux albumines) . . . . .	155 min.

Les minutes et secondes se rapportent au temps utilisé par 100 cc. de solution pour passer au travers de l'ultrafiltre considéré.

Les cinq milieux ainsi préparés donnent tous lieu à une abondante formation de zygotes, comparable à celle du témoin qui n'a pas subi de filtration.

Dans une seconde expérience, en utilisant le filtre le plus fin (155 minutes) nous obtenons les mêmes résultats.

Il n'est donc pas possible d'obtenir par ultrafiltration un maltose ordinaire ayant perdu ses propriétés actives.

On en déduira que l'impureté jointe au maltose passe au travers du plus fin des ultrafiltres utilisés.

Purification par cristallisation.

Nous préparons un sirop très concentré de maltose Kahlbaum. Par l'alcool absolu, nous obtenons un précipité qui, desséché à l'exsiccateur, est constitué par du maltose anhydre ( $C^{12} H^{22} O^{11}$ ) et qui, hydraté à nouveau, nous donne la substance qui sert à la préparation des milieux de culture ( $C^{12} H^{22} O^{11} H^2O$ ).

Le milieu est préparé avec 10 g. de ce maltose, 0,5 g.  $\frac{0}{100}$  d'asparagine ainsi qu'avec les sels habituels et 2% d'agar. Stérilisation  $\frac{15 \text{ minutes}}{115^\circ}$

Lumière. Souches Burgeff 3 et 4. Le témoin est préparé avec 10 g. d'un mélange de maltose B. D. H. et Poulenc, qui sont inactifs les deux. Dans un cas, nous avons fait une seule cristallisation, dans un autre, six.

Dans un cas, nous avons recueilli les alcools de cristallisation (350 cc.) qui ont été évaporés sous le vide; au cours de l'évaporation, à deux reprises, le maltose restant en solution dans l'alcool est précipité; il reste finalement, après évaporation totale, un résidu (contenant encore un peu de sucre) qui est dissous dans 2 cc. d'eau distillée; ceux-ci sont ajoutés à un deuxième témoin qui devra nous montrer si l'impureté a été réellement extraite et si, adjointe à une culture à base de maltose « inactif », elle lui confère des propriétés spéciales.

Après 15 jours de culture :

Témoin maltose in-actif	Kahlbaum ordinaire	Kahlbaum purifié par cristallisation	Témoin + impureté																															
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">pas de ligne de réaction entre les 2 mycéliums</p>	1	2	0	0	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">200</td> <td style="text-align: center;">250</td> <td style="text-align: center;">210</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">zygotes</td> </tr> </table>	1	2	3	200	250	210	zygotes			<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">8</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">zygotes</td> </tr> </table>	1	2	3	2	3	8	zygotes			<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">4</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">zygotes</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">ligne de réaction nette; <i>copulations avortées</i></p>	1	2	3	2	2	4	zygotes		
1	2																																	
0	0																																	
1	2	3																																
200	250	210																																
zygotes																																		
1	2	3																																
2	3	8																																
zygotes																																		
1	2	3																																
2	2	4																																
zygotes																																		
mycélium aérien nul	développement végétatif intense	végétatif intermédiaire	intermédiaire																															

Le résultat le plus net est que, par une seule cristallisation, il est possible d'enlever au maltose K. d'une façon quasi totale, son action spéciale sur la sexualité.

Très singuliers sont, par contre, les résultats obtenus avec l'impureté adjointe au maltose inactif; les cultures, au point de vue du développement végétatif sont nettement différentes — supérieures — à celles que fournit le témoin inactif mais les affinités sexuelles ne parviennent cependant pas à s'exprimer. On peut supposer qu'une grande partie de l'impureté a été soustraite au maltose K. par cristallisation; ce qu'il en doit rester est insuffisant pour dépasser le seuil d'un faible développement végétatif et arriver à une manifestation intense de la sexualité.

Les teneurs en azote des maltoses recristallisés sont les suivantes :

Kahlbaum ordinaire . . . . .	0,49 % N.
» cristallisé une fois . . . . .	0,255 % N.
» » quatre fois . . . . .	0,29 % N.

Il est indiscutable que près de la moitié de l'azote a disparu, en même temps que l'activité particulière du maltose K. Nous pouvons, d'autre part, déduire de cette expérience que la substance active ne doit constituer qu'une fraction, probablement assez minime, de l'azote adjoint au maltose K., ce que l'on pouvait déjà prévoir.

Devrons nous faire intervenir une substance active et considérer ses manifestations sur la sexualité comme un corollaire de son action sur le développement végétatif ou faire intervenir une substance agissant sur le développement végétatif et une sur la sexualité ? La question ne peut encore être résolue.

Purification par l'alcool absolu au Soxhlet.

Des quantités variables de maltose Kahlbaum sont traitées au Soxhlet (de 3 à 5 heures). Après ce temps d'action de l'alcool bouillant, une petite quantité de maltose est entraînée et se trouve dans

l'alcool d'extraction, précipitée en partie au fond du ballon. L'alcool est ensuite évaporé et, si la quantité de sucre entraînée n'est pas trop élevée, nous employons le tout (sucre entraîné et impureté) en l'adjoignant au milieu inactif. Si la quantité en est trop élevée (supérieure à 0,5 g.) nous décantons une ou deux fois l'alcool au cours de la précipitation afin d'éliminer l'excès de maltose entraîné. L'adjonction aux milieux expérimentaux de 0,5 g. de maltose accompagnant l'impureté n'introduit dans l'expérience aucune cause d'erreur appréciable. (8 g. de maltose inactif additionnés *de 2 g. de maltose Kahlbaum* commencent seulement à donner quelques zygotes !)

Les maltoses purifiés sont ajoutés à la dose de 10 % au milieu de Coons ordinaire.

Stérilisation :  $\frac{15 \text{ minutes}}{115^\circ}$ .

Lumière.

Température : 18 à 20° C.

Souches Blakeslee (+) et (-). Après 8 jours :

1. Témoin, Kahlbaum ordinaire 4 essais	2. Kahlbaum purifié 5 essais	3. Merck crist. inactif + impureté 5 essais
Très large ligne de zygotes formées, noires.	Très faible ligne de zygotes; rares zygotes formées.	Large ligne de zygotes (1 cm env.). Un peu moins avancée qu'en 1.
Très fort développement végétatif.	Très faible développement végétatif. Semblable à l'aspect des cultures sur Merck crist. pur.	Fort développement presque aussi intense qu'en 1.

Souches Blakeslee (+) et (-). Après 9 jours :

Témoin Maltose Schuchardt inactif 1 essai	Schuchardt + impureté 2 essais	Kahlbaum purifié 4 essais
12 zygotes	1. 190—200 zygotes 2. 90—100 »	1. 8 zygotes 2. 0 » 3. 10 » 4. 2 »
mycélium aérien très faiblement développé	mycélium aérien dense	mycélium aérien très faiblement développé

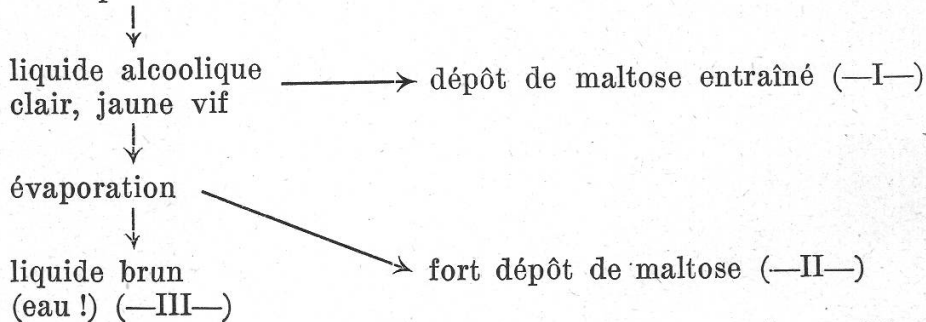
Il semble donc que ce traitement à l'alcool absolu, lorsqu'il est prolongé, prive le maltose de Kahlbaum de la substance qui lui conférerait ses propriétés particulières; de même, quoique d'une façon inconstante, les alcools évaporés fournissent une substance qui, ajoutée

à un milieu inactif — lui donne une activité qui le fait se rapprocher du milieu à base de maltose Kahlbaum.

Le maltose technique de Merck, jaunâtre, très impur suffit à lui seul, ajouté à l'agar, à couvrir les besoins du champignon (croissance et sexualité). Nous avons pensé qu'en partant d'un tel échantillon de maltose, il serait peut-être plus facile d'obtenir l'impureté.

20 g. de maltose technique Merck sont traités au Soxhlet; les alcools d'extraction sont fortement jaunâtres.

20 grammes maltose  
technique de Merck  
traité par alcool



Nous admettons que la petite quantité de maltose déposée lors de l'évaporation des alcools d'extraction est elle-même fortement contaminée par l'impureté entraînée, dont une bonne partie doit être en solution dans l'alcool ou l'eau.

I. — ½ gramme environ de sucre déposé pendant la première partie de l'évaporation de l'alcool d'extraction.

II. — 1½—2 grammes déposés lors de l'évaporation finale.

III. — 2 cc. de liquide brun restant.

Les milieux sont préparés avec du maltose de Merck cristallisé, à 10 ‰, et avec les autres substances habituelles; agar 2 ‰.

Stérilisation:  $\frac{10 \text{ minutes}}{115^\circ}$ .

Lumière.

Souches Blakeslee (+) et (—).

Les fractions I, II et III sont ajoutées au milieu indiqué.

Après 8 jours :

Témoin Merck crist. seul.	+ I 2 essais	+ II 2 essais	+ III 2 essais
0 zygote; très faible ligne de réaction	Très large ligne, dense, de zygotes	Large ligne de zygotes	1. une ligne de zygotes, large mais interrompue, de 50 zygotes formées 2. ligne de copulation blanche, nette; zyg. non formées
Faible développement végétatif aérien	Très fort développement végétatif		Développement végétatif plus faible

Cet essai montre avec évidence que l'alcool absolu entraîne du maltose technique de Merck, une substance qui, jointe à la petite quantité de sucre entraîné et ajouté avec ce dernier au maltose inactif, lui confère son activité spéciale.

#### A c t i o n d e l a c h a l e u r s u r l e m a l t o s e K a h l b a u m.

Le fait que tous nos milieux sont stérilisés à 115—120° fournit déjà une indication; nous nous sommes demandé à quelle température disparaîtrait l'action particulière de ce maltose. Il est impossible de chauffer à une température élevée si le sucre est en solution aqueuse : une hydrolyse est à craindre. Nous avons *chauffé à sec, sous 15 mm. de pression*, le tube contenant le sucre plongé dans un bain de paraffine.<sup>1</sup>

Sucre chauffé :	Culture sur Coons ordinaire en vase plat :
15 minutes à 135°.	Large ligne de zygotes. Développement végétatif intense.
15 minutes à 150°. (maltose anhydre.)	Faible ligne de zygotes. Faible développement du mycélium aérien.
10 minutes à 160°.	Après 10 jours, 20 zygotes. Très faible développement du mycélium aérien; presque identique à un témoin fait avec maltose cristallisé de Merck.
15 minutes à 180°.	Des milieux de culture liquides (Coons) en éprouvette sont utilisés. Témoins avec Kahlbaum ordinaire et Merck cristallisé. Après 20 jours dans le tube maltose chauffé, le mycélium aérien émergé est presque 4 fois moins développé que dans les 2 témoins.

Il semble donc bien qu'avec les conditions de chauffage indiquées une température de 150 à 160° enlève au maltose Kahlbaum son activité particulière. Ce fait n'est pas surprenant et n'est pas incompatible avec l'existence d'une substance active; il faut penser que le chauffage a lieu dans le vide et qu'à la pression ordinaire la température limite eût été beaucoup plus basse; d'autre part, il faut se souvenir que les fractions thermostables de la vitamine B (B<sup>2</sup>) gardent leur action après un traitement de plusieurs heures à l'autoclave, à 120°. De même le « bios », substance active analogue à une vitamine et indispensable à la croissance et au bon développement des levures, est également thermostable.

En ce qui concerne la vitamine B, N i t z e s c u (1923) montre qu'en milieu humide, la température de 100° agit déjà d'une façon sensible

<sup>1</sup> Vers 145° le maltose ordinaire (C<sup>12</sup>H<sup>22</sup>O<sup>11</sup>.H<sup>2</sup>O) perd son eau et se transforme en maltose anhydre. Comme nous avons pesé avant le chauffage 10 grammes de maltose, il suffit ensuite, dans le même tube, de les dissoudre dans l'eau pour obtenir le milieu de culture.

sur le facteur B. contenu dans les graines, tandis que la chaleur sèche (120°) est inoffensive. Sherman et Grose (1923) montrent que pour le jus de tomate, quatre heures de chauffe à 130° se manifestent par un pourcentage de destruction de 55 %. Il ne nous semble pas paradoxal que notre impureté, adsorbée probablement par une partie de la substance azotée jointe au maltose, résiste sous le vide à une température élevée.

La calcination, comme nous l'avons montré, détruit totalement l'action de cette impureté.

#### Purification par adsorption.

L'adsorption est une méthode qui a rendu de grands services, soit pour la purification des enzymes, soit pour l'extraction de certaines vitamines des substances complexes auxquelles elles sont jointes. Les vitamines B. en particulier, de même que le « bios » sont connus par la facilité avec laquelle elles sont adsorbées par le noir animal, la silice colloïdale, etc. Dans les premières expériences, nous nous sommes contenté de préparer une solution de maltose Kahlbaum à 10 g. ‰, de la soumettre pendant un quart d'heure à l'ébullition en présence de noir animal, puis de filtrer; malheureusement, cette méthode est impraticable, car une forte quantité de maltose est adsorbée et les effets végétatifs observés ne doivent pas être rapportés à l'absence de l'impureté active mais à la diminution de la concentration en sucre.

Pour supprimer la cause d'erreur due à l'adsorption du sucre, nous l'avons extrait de sa solution par l'alcool absolu ou par dessiccation; de cette façon, nous pouvons préparer un milieu avec la dose normale de sucre, pesée.

Milieu : Coons normal + 2 ‰ agar, 10 ‰ de maltose; asparagine 0,5 g. ‰.

Stérilisation :  $\frac{10 \text{ minutes}}{115^\circ}$ .

Lumière.

Souches Burgeff, 4 (—), 7 (+).

Température : 15°.

Après 15 jours :

Témoin: maltose Kahlbaum ordinaire	maltose Kahlbaum traité par noir animal
180 zygotes Développement végétatif intense	1 zygote Développement végétatif faible

Teneur en azote du maltose.

Kahlbaum traité au noir animal . . . . .	inappréciable
» normal . . . . .	0,49 %
» recristallisé . . . . .	0,25—0,29 %



Le noir animal utilisé est du Merck puriss., lavé auparavant plusieurs fois jusqu'à obtenir des eaux de lavage neutres (pH 7 env.).

Les expériences effectuées avec la terre à foulon et la terre d'infusoire sont moins concluantes. Nous avons adopté définitivement le noir animal comme élément d'adsorption.

Les expériences faites pour défixer l'impureté adsorbée n'ont pas, jusqu'à maintenant, donné de résultats satisfaisants.

La possibilité d'adsorber l'impureté active constitue une analogie de plus avec le groupe des vitamines B et des substances voisines.

Des résultats obtenus jusqu'à maintenant, il est possible de tirer quelques conclusions partielles. Au maltose Kahlbaum se trouve jointe une impureté de nature azotée; elle ne doit constituer qu'une fraction probablement très petite de l'azote total joint au sucre.

Elle est soluble dans l'eau, très thermostable, puisqu'il faut un chauffage de 160° *sous le vide* pour annuler son action. On peut la détacher du maltose par recristallisation de ce dernier dans l'alcool éthylique ou l'entraîner par l'alcool absolu bouillant au Soxhlet.<sup>1</sup> De même, elle semble adsorbable par le noir animal purifié, plus faiblement par d'autres substances adsorbantes. Cette impureté — le milieu étant liquide — dans les conditions de l'expérience — augmente considérablement le développement de *Phycomyces*, par rapport à d'autres milieux de culture préparés avec des échantillons de maltose commercial très pur. Cette même impureté — le milieu étant solide, agarisé — semble indispensable dans les conditions de nos expériences<sup>2</sup> pour obtenir une abondante récolte de zygotes et une manifestation normale de la sexualité; si le milieu solide ne contient qu'un maltose très pur, le développement végétatif est insignifiant et la formation des zygotes quasi nulle.

La dose à laquelle la substance inconnue est active peut être approximativement déterminée. Si l'on suppose active la quantité totale d'azote jointe au sucre, soit 0,49 g. % du sucre, sa teneur dans 100 cc. d'un milieu contenant 10 g. de ce maltose serait de 0,049 g.; si l'on admet que la dixième partie seule de cet azote est contenue dans la substance active — ce qui, certainement, est encore trop fort — nous arrivons à 0,0049 g. %, c'est-à-dire 0,000049 g. par cc. de milieu de culture ! Tous les caractères certains que nous avons passés en revue, rendent de plus en plus plausible l'assimilation de notre substance active avec le groupe des vitamines hydrosolubles B et des substances annexes. La justification de cette assimilation sera discutée dans un chapitre suivant.

---

<sup>1</sup> Dans ce cas le maltose obtenu est totalement ou en partie privé de l'azote qui lui était auparavant adjoint.

<sup>2</sup> Avec des doses de 0,5 à 1 g. % d'asparagine comme source d'azote.

### 6. Action de vitamines purifiées.

Un grand nombre de microorganismes sont très sensibles à l'action des vitamines et des substances voisines. Le sujet est, actuellement encore, très confus. On sait que pour le développement des levures, une substance auxiliaire, le « bios » (de Wildiers) voisin des vitamines B, est indispensable; les vitamines B proprement dites ont une action favorisante sur certains organismes (*Streptothrix corallinus*, d'après Reader 1928). Dans d'autres cas, on a cru pouvoir montrer que le liquide de culture de *Penicillium* possède des propriétés curatives en ce qui concerne la carence en facteur B. Il y aurait donc eu synthèse de vitamines B. par le champignon. Avant même que l'étude des vitamines eût pris son essor, les microbiologistes et les mycologistes ont signalé pour beaucoup d'organismes, l'apparition dans leurs milieux de cultures, de substances inhibitrices ou accélératrices du développement dont l'effet va depuis le staling effect de Brown jusqu'à une accélération assez considérable de la croissance. Dans beaucoup de cas, ces substances se sont révélées des produits banals du développement (acide oxalique p. ex.); dans d'autres, il s'agit, très probablement, de substances actives au sens propre du mot.

Aucun auteur n'a étudié l'action des substances actives sur la sexualité des microorganismes.

Comme source de vitamines B (et substances voisines) nous avons utilisé la levure de brasserie et les diverses préparations que l'on en peut obtenir.

#### Utilisation de levures du commerce.

Au milieu de Coons ordinaire, avec 2 % d'agar et 10 % de maltose « inactif » de Schuchard, nous ajoutons des quantités croissantes de levures sèches totales. Le tout est stérilisé à 110° pendant 15 minutes. L'extrait aqueux concentré de levures donne une réaction neutre.<sup>1</sup>

Les levures ont été séchées dans le vide à basse température.

	Témoin sans levure	Levure		
		1/2 %	1 %	2 %
4° jour	pas de mycélium aérien 0 zygotes	mycélium aérien bien 15 zygotes	développé 100 zygotes	1. 140 zygotes 2. 100 »
7° »	35 zygotes	140 zygotes	large ligne de zygotes de 1 cm plus de 1000 zygotes	

<sup>1</sup> Lumière — Température 15—20°. Souche Blakeslee (+) et (—).

### Utilisation des extraits de levures.

Nous utilisons les extraits suivants :

- I. Extrait aqueux total : 10 g. de levures sèches sont autoclavés à 120° pendant 15 minutes dans 50 cc. d'eau, puis filtrés.
- II. Extrait aqueux total : Dégraissé par l'éther.
- III. Extrait alcoolique : 10 g. de levures sèches sont soumis à l'alcool absolu pendant 6 heures au Soxhlet. Evaporation de l'alcool puis reprise du résidu par eau courante.
- IV. Extrait alcoolique : Le même que pour III, mais la solution aqueuse finale est dégraissée par l'éther.
- V. Témoin : Mélange de maltoses Schuchardt et Merck, inactifs.

Les extraits sont ajoutés à la dose de 5 cc. pour 100 cc. de milieu.

Nombre de zygotes :

	I.	II.	III.	IV.	V.
4 <sup>e</sup> jour. . . .	400	300	150	160	5
7 <sup>e</sup> „ . . . .	900 à 950	850 à 900	1200 à 1400	550 à 600	5

### Utilisation d'un précipitat de levures.

Nous utilisons, pour la précipitation, la méthode de Tholin qui a obtenu à partir de la levure des préparations très actives de cozymase et de vitamines B dont il cherche à connaître l'action sur la fermentation alcoolique.

Nous laissons 100 grammes de levures macérer pendant 48 heures dans 1 litre d'eau; chauffage à 100° pendant 10 minutes; filtration.

- I. — Précipitation avec un volume d'alcool à 100°. Obtention d'une poudre blanc-jaunâtre.
- II. — Les résidus alcooliques sont concentrés sous le vide, adjonction de 6 volumes d'acétone. — Obtention d'un précipité blanc-jaunâtre, hygroscopique.

Ces deux précipités, séchés, après avoir été triturés par l'alcool absolu, sont adjoints au milieu de Coons et *stérilisés avec lui pendant 15 minutes à 115°* (avec sucre inactif). L'action prolongée de la chaleur élimine toute action diastasique.

1<sup>er</sup> essai : 0,1 g. de substance dans 75 cc. de milieu de Coons, 2 % agar, 10 % de maltose Merck. Après 6 jours.

Témoin Coons seul	Coons + fraction I	Coons + fraction II
aucun mycélium aérien; très faible ligne de réaction entre les mycéliums des 2 sexes; pas de zygotes	fort développement du mycélium aérien. Très large ligne de zygotes (10 mm); zygotes très nombreuses, un peu plus précoces avec la fraction II qu'avec I	

2<sup>me</sup> essai : adjonction de 0,05 g. de précipitat à 75 cc. de milieu de culture.

Mêmes conditions de culture que précédemment.

Mêmes résultats après 7 jours. Sur le témoin : très faible développement du mycélium aérien; pas de zygotes. Avec adjonction des fractions I et II, large ligne de zygotes, bien fournie.

3<sup>me</sup> essai : adjonction de 0,01 et 0,02 g. de précipitat à 75 cc. de milieu (fraction II seule).

Mêmes conditions de culture que précédemment. Après 8 jours :

Témoin	+ Fraction II 1 0,01 ‰	+ Fraction II 2 0,02 ‰
pas de mycélium aérien pas de zygotes	mycélium aérien bien développé large ligne de copulation avec nombreuses zygotes formées	

Ce dernier essai montre une grande différence entre le témoin sans précipitat et le milieu avec précipitat, mais les zygotes semblent s'y former plus lentement, indiquant que — dans les conditions expérimentales de nos cultures — nous sommes près de la limite d'action.

#### Utilisation des concentrés de vitamines B.

Osborne et Wakeman (1919) ont préparé à partir de la levure, une substance très purifiée et très concentrée présentant les caractères des vitamines B. Par fractionnement de leur précipité, ils sont parvenus à obtenir un concentré extrêmement actif qu'ils ont standardisé et que les laboratoires Harris (New-York) livrent aux biologistes.

Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaunâtre, *entièrement soluble* dans l'eau. Il doit contenir, selon les auteurs, les vitamines B 1 et B 2 et, à notre sens, d'autres facteurs encore.

Ce concentré est ajouté au milieu de Coons ordinaire avec 10 ‰ de maltose Merck inactif et 2 ‰ d'agar. Il est stérilisé avec le milieu pendant 15 minutes à 120°.

Mêmes conditions d'expérience que précédemment. Après 5 jours :  
Souches 4 (—) et 7 (+) Burgeff.

Témoin	Adjonction de 2½ mg de concentré	Adjonction de 5 mg de concentré
très faible développement du mycélium aérien pas de zygotes	développement le plus intense constaté jusqu'ici; ligne de zygotes si dense qu'elle paraît complètement noire. Impossibilité de dénombrer des zygotes	

Utilisation de l'acide nucléinique. Action possible  
des cendres.

Mêmes conditions de culture que précédemment.

Souches 4 (—) et 7 (+) Burgeff.

On peut se demander si l'acide nucléinique ne serait pas responsable de cette action particulière. Des expériences effectuées en ajoutant au milieu de Coons ordinaire, avec 10 % de maltose inactif, de l'acide nucléinique, ne permettent pas de mettre en évidence cette action; cette substance ne doit pas intervenir ici.

De même, nous avons calciné 5 g. de concentré de vitamines Harris; les cendres ont été adjointes au milieu de Coons préparé avec 10 % de maltose inactif. Aucune action spéciale. Un catalyseur minéral ne semble donc pas — dans les conditions de nos expériences — devoir intervenir.

Essai d'adsorption de la substance active  
contenue dans le concentré de vitamines Harris.

Une solution de concentré à 1 % est divisée en 2 parts de 50 cc.; l'une est traitée au noir animal : ébullition pendant 15 minutes; filtration; le liquide obtenu est complètement incolore; l'autre part reste intacte.

Adjonction de 3 cc. de cette solution à un milieu de Coons avec 10 % de maltose inactif, 2 % d'agar et 0,5 ‰ d'asparagine.

Stérilisation:  $\frac{10 \text{ minutes}}{115^\circ}$ . Lumière.

Souches 7 (+) et 15 (—) Burgeff.

Ce couple présente peu d'affinités sexuelles et même sur un milieu favorable forme peu de zygotes. Nous l'avons choisi à dessein. Après 8 jours :

Témoin sans vitamines	Adjonction de vitamines non traitées	Adjonction de vitamines traitées au noir animal
Très faible mycélium aérien Pas de zygotes	Mycélium aérien très fortement développé, touffu large ligne de zygotes	Très faible mycélium aérien Pas de zygotes

De cet ensemble d'essais, il ressort que la levure, riche en vitamines B et substances voisines, et les substances que l'on en peut extraire ou précipiter, ont une action très nette sur la croissance et la sexualité de *Phycomyces*. Cette action est analogue à celle du maltose Kahlbaum; dans le cas du concentré de vitamines Harris, elle est extraordinairement plus intense, la dose active est de  $2\frac{1}{2}$  mg. pour 50 cc. de milieu soit 0,0005 g. par cc. de milieu. Comme pour le maltose Kahlbaum, l'adsorption par le noir animal fait disparaître la substance

active. Il est très probable qu'il s'agisse, dans les deux cas, d'une substance de même nature. De toute façon, l'identification de notre corps actif avec une substance de nature vitaminique devient plus plausible encore.

### 7. Essai d'identification du facteur actif joint au maltose K.

Avant de considérer notre substance comme un nouveau facteur, il est nécessaire d'essayer de l'identifier avec les facteurs vitaminiques déjà connus, à action analogue.

Seuls entrent ici en considération les facteurs hydrosolubles et thermostables (nos milieux sont stérilisés à 120° !). Il nous reste tout le complexe de la vitamine B et des facteurs voisins, soit, d'après les connaissances actuelles :

- 1° facteur B<sup>1</sup>, antinévritique; relativement thermolabile
- 2° facteur B<sup>2</sup>, antipellagreu *thermostable*, facteur P. P.

Nous avons de même les facteurs de croissance des micro-organismes :

- 1° Le « Bios » de Wildiers (vitamine D de Funk), vitamine de croissance des microorganismes ou, comme l'ont appelé R andoin et Lecoq (1928) « vitamine d'utilisation cellulaire, de croissance cellulaire » : très thermostable.
- 2° La co-zymase de Harden, Euler et ses collaborateurs.
- 3° Le facteur Z (Z<sup>1</sup> et Z<sup>2</sup>) de Tore Philippon.

Le facteur B<sup>1</sup> n'intervient pas; d'ailleurs l'extrait de levures Harris a été reconnu en contenir fort peu. Le malt duquel nous supposons issu le facteur actif du maltose Kahlbaum *pourrait* en contenir; il est peu probable qu'il résiste à une stérilisation à 120°.

*Par contre le facteur B<sup>2</sup>, très thermostable et si répandu peut intervenir.*

Parmi les facteurs propres aux microorganismes, il faut distinguer nettement le bios qui accélère la croissance des cellules de levures, sans intervenir dans la fermentation, du facteur Z et de la co-zymase qui agissent sur la fermentation (l'un de la levure sèche, l'autre de la levure vivante) mais qui sont inactifs en ce qui concerne la croissance. Les facteurs dits de fermentation ne doivent pas intervenir pour notre champignon. Les Mucorinées sont susceptibles de produire, dans certaines conditions (en anaérobiose) une fermentation alcoolique. Mais nos cultures étant en aérobiose, le problème de la fermentation alcoolique ne se pose pas. Il est possible que co-zymase et facteur Z se retrouvent dans les extraits de levures, surtout dans ceux que nous avons préparés nous-même, mais ce ne sont pas eux qui doivent intervenir dans la croissance et dans la sexualité de *Phycomyces*, cultivé dans les conditions expérimentales indiquées. D'ailleurs, la haute tem-

pérature à laquelle nous stérilisons nos milieux, détruit certainement leur action. Il est fort probable que si nos cultures étaient en anaérobiose et le siège d'une fermentation alcoolique et que nous inhibions l'action de la zymase par l'acide monoiodacétique, l'effet de notre substance active continuerait à se manifester !

Il nous reste, donc, soit le bios, soit le facteur B<sup>2</sup>. Le problème de leur identité ne se pose plus : on sait que la substance extraite de la levure et qui agit sur l'utilisation nutritive et sur l'équilibre nerveux du pigeon et du rat (facteur antinévritique et antipellagreu) n'est pas celle qui rend les cultures de levures abondantes et rapides.

Il ne nous est pas possible de choisir : seule l'expérimentation sur l'animal indiquerait si notre maltose est doué également de l'une des propriétés du complexe B.

Tant que la composition chimique de chacune de ces deux substances n'est pas exactement connue, on ne peut avec certitude faire le départ entre les deux substances. Nous ne pouvons suivre les auteurs travaillant avec un extrait de levures qui, si purifié soit-il, *n'est pas une substance chimiquement définie*, et qui ne veulent reconnaître que l'un ou l'autre des deux facteurs cités. Il est certain que dans quelques cas on peut distinguer nettement ce qui revient à l'un et à l'autre, mais il ne faut pas oublier que R a n d o i n et L e c o q ont montré que la vitamine de croissance cellulaire est indispensable au pigeon. F u n k lui-même qui l'avait distinguée de la vitamine B (à la suite d'expériences effectuées sur les animaux alors que W i l d i e r s partait d'essais portant sur des levures) croit (1924) que cette substance joue un rôle important dans tous les organismes vivants. Nous admettons donc que cette substance est soit la vitamine B<sup>2</sup>, soit une fraction du bios, soit une substance voisine de ces deux corps. Cette même substance se retrouverait dans l'extrait de levure qui s'est montré si actif.

Le problème principal pour nous est celui de l'action sur la sexualité. Chez ces organismes, les phénomènes de la nutrition et de la sexualité sont si contingents, que tout ce qui agit sur la nutrition retentit également sur la sexualité. Cependant — voir l'action de la gélatine — il existe des conditions de nutrition, telles que la croissance s'effectue d'une manière intense et que la sexualité ne se manifeste pas ! Il n'est donc pas certain que notre substance soit simple, qu'elle agisse d'une manière favorable sur la croissance et la nutrition et, par contre-coup, sur la sexualité. On peut simplement dire : ou bien il s'agit de deux substances différentes, ou il s'agit d'une seule et même substance et dans ce cas, *il faut faire intervenir la notion de seuil : jusqu'à une certaine dose, elle favorise nutrition et croissance, au-dessus de ce seuil, elle déclanche avec intensité les affinités sexuelles.*

### 8. Conditions et mode d'action du facteur actif.

Dans les expériences effectuées jusqu'à maintenant, nous avons utilisé un milieu de Coons de composition invariable (sucre 10 %, asparagine 0,5 ‰). C'est avec ce milieu que nous observons l'action particulière du maltose Kahlbaum par rapport aux autres maltoses dont l'action est nulle, ainsi que par rapport aux autres mono- et disaccharides utilisés.

Nous établissons ici ce qui arrive si les conditions chimiques de culture changent.

#### Maltoses utilisés seuls.

Les divers maltoses sont ajoutés au taux de 10 % à un milieu de Coons de formule saline habituelle mais *privé d'azote* (asparagine) avec 2 % d'agar.

Stérilisation :  $\frac{10 \text{ minutes}}{115^\circ}$ .

Lumière

115°

Température : 20°.

Souches 4 (—) et 7 (+) Burgeff.

Après 10 jours :

Maltose Merck cristallisé	Schuchardt cristallisé	Schuchardt crist. chim. pur	Poulenc pur
1. 180 zygotes	210 zygotes	200 zygotes	160 zygotes
2. 200 »			150 »

Partout : faible mycélium aérien et de surface; les zygotes sont en ligne étroite, presque en file.

Kahlbaum ordinaire	Kahlbaum purif. par alcool	B. D. H.
1. 180 zygotes	220 zygotes	210 zygotes
2. 180 »		160 »

Partout : très faible densité du mycélium aérien.

Témoin : même milieu, mais *adjonction de 0,8 ‰ d'asparagine*.

Kahlbaum ordinaire	Merck cristallisé	Schuchardt	B. D. H.	Poulenc
mycélium aérien très dense		mycélium aérien très faible		
large ligne de zygotes	4-5 zygotes	0 zygote	6 zygotes	3 zygotes

Il ressort de ces expériences le résultat singulier que, lorsque le milieu est *privé d'azote*, tous les maltoses, y compris celui de Kahl-



baum donnent des résultats sensiblement identiques; les échantillons qui, avec asparagine, ne donnaient rien, fournissent la même récolte que le maltose de Kahlbaum qui auparavant en donnaient une beaucoup plus forte. Il y a comme un nivellement général.

La culture a un aspect très pauvre; pas de mycélium aérien, les zygotes sont en ligne, isolées; l'ensemble offre une apparence bien différente de celle que présentent les cultures avec maltose Kahlbaum, même lorsque celles-ci n'ont que 200 zygotes.

Comme de toute façon, il doit y avoir une source d'azote, il faut penser soit à l'azote atmosphérique dont l'utilisation par les champignons inférieurs devient de plus en plus certaine, soit à l'azote de l'agar qui est abondant mais réputé non assimilable, soit tout simplement à l'impureté azotée jointe à divers échantillons de maltose.

Par contre, si l'on ajoute au milieu, une dose d'asparagine allant jusqu'à 1%, on voit tous les échantillons donner lieu à des cultures où les affinités sexuelles ne se manifestent plus, tandis que le maltose Kahlbaum fournit ces cultures luxuriantes si caractéristiques.

Ce fait singulier nous aidera à comprendre le mode d'action de l'impureté vitaminique jointe au maltose.

#### Action des autres sucres employés sans azote.

Mêmes conditions d'expérience que pour la première série.

Saccharose	Glucose	Lactose	Galactose	Lévulose
1. 100 zygotes	75 zygotes	20 zygotes	25 zygotes	90 zygotes
2. 112 »	80 »	11 »	—	65 »

Partout: très faible mycélium aérien, analogue à celui des maltoses cultivés sans azote.

A part le lactose et le galactose, les autres sucres se prêtent aux mêmes remarques que les divers maltoses. Avec la dose normale d'asparagine, ils ne donnent naissance à aucune zygote; employés sans azote, ils arrivent presque à fournir les mêmes cultures que les maltoses sans azote.

En ce qui concerne la source de leur azote, on peut faire la même remarque que pour les maltoses.

#### Action des concentrés de vitamines B (Harris) sur les cultures sans azote.

Les concentrés de vitamines B. agissant d'une façon très favorable sur les cultures ordinaires avec échantillon de maltose purifié (+ azote), nous nous sommes demandé si le même effet se produirait en l'absence de la source habituelle d'azote.

Milieu de Coons ordinaire avec 10 % de maltose inactif et 2 % d'agar, *sans azote*.

Mêmes conditions de culture que pour les précédentes séries.

Témoin sans vitamines	Adjonction de 0,04 % de vitamines Harris, stérilisées avec le milieu	
140 zygotes en ligne: aspect typique des cultures sans azote. très faible développement du mycélium aérien	1. 400 zygotes mycélium aérien beaucoup plus dense sans cependant atteindre l'aspect des cultures maltose Kahlbaum + asparagine	2. 390 à 400 zygotes plus dense sans cependant atteindre l'aspect des cultures maltose Kahlbaum

L'adjonction de vitamines B agit d'une manière très favorable sur les milieux de culture privés de leur azote normal.

#### Action des concentrés de vitamines B sur les sucres autres que le maltose.

Milieu de Coons normal, avec 10 % de sucre, 2 % d'agar et 1 ‰ d'asparagine.

Mêmes conditions de culture que pour les précédentes séries. Sur ces milieux, il n'y a aucune formation de zygotes.

Adjonction de 0,04 % de concentré de vitamines B (Harris) stérilisé avec le milieu.

Après 10 jours :

Saccharose	Glucose	Galactose	Lactose
large ligne de zygotes, mycélium aérien touffu, aspect semblable à celui du maltose Kahlbaum	ligne de zygotes un peu moins large	zygotes abondantes mais se formant d'une façon tardive	faible développement 50 zygotes environ

Nous observons donc que les sucres autres que le maltose qui, agissant dans des conditions de culture telles qu'ils ne donnent lieu à aucune formation de zygotes, deviennent actifs par adjonction de concentré de vitamines B.

En conclusion : en privant un milieu de Coons, à base de maltose ou d'autres sucres, de son azote (asparagine) on produit un nivellement des cultures, parmi lesquelles on ne peut plus distinguer l'action du maltose Kahlbaum.

*C'est en présence d'une dose déterminée d'asparagine que les cultures faites avec du maltose Kahlbaum se distinguent par l'action*

*extraordinairement nette*: c'est donc dans ces conditions que l'impureté active, jointe au maltose Kahlbaum agit avec son maximum d'intensité. Les cultures sans azote sont activées par l'adjonction de vitamines B.

En trouvant ainsi une condition expérimentale dans laquelle l'impureté jointe au maltose Kahlbaum n'agit pas, nous avons immédiatement une voie ouverte pour arriver à la compréhension du mode d'action de cette impureté active.

L'explication que nous fournissons de ces faits est la suivante: Pour *Mucor hiemalis* (ainsi que pour *Phycomyces*) nous avons montré que la formation des zygotes dépend de la teneur en sucre, de la teneur en azote et du rapport  $\frac{\text{sucre}}{\text{azote}}$  ou  $\left(\frac{\text{Carbone}}{\text{azote}}\right)$ . Dans une série à maltose variable et à azote constant, l'intensité de la formation des zygotes sera proportionnelle à la teneur en sucre. Si dans une autre série à sucre variable, nous augmentons la teneur (constante) de l'azote, les zygotes commenceront à se former avec une dose de sucre plus élevée que dans la série précédente. Autrement dit, l'asparagine exerce une sorte d'inhibition sur le développement végétatif et sur la sexualité; elle doit être présente à un taux inférieur limite; si ce taux s'élève, il faut une dose de maltose croissante pour lutter contre cette inhibition, cela jusqu'à une certaine limite à partir de laquelle la concentration moléculaire totale devient trop élevée pour permettre un développement normal du champignon.

Or, nous venons de voir qu'avec une dose minime d'azote (asparagine) les zygotes se formaient (pour un taux donné de sucre) avec tous les échantillons de maltose; les taux supérieurs d'azote (asparagine) sont inhibiteurs, sauf pour le maltose Kahlbaum. Tout se passe donc comme si l'impureté active jointe à ce dernier échantillon de maltose aidait le champignon à résister à l'inhibition due à un taux trop élevé d'azote (asparagine). L'action extraordinairement favorable des extraits de vitamines caractérisées, adjoints aux maltoses inactifs est une preuve à l'appui de cette conception.

Par quel mécanisme se produit cette action ?

On sait que certaines levures fermentent plus rapidement le maltose que d'autres sucres. Trautwein et Wassermann (1929) étudiant 15 levures en trouvent trois pour lesquelles la demi-période de fermentation est inférieure à celle du glucose et du saccharose. Les auteurs ne peuvent expliquer le fait qu'en faisant intervenir l'opinion de l'école de Willstätter qui affirme que le maltose peut être fermenté directement sans être au préalable hydrolysé en glucose. D'ailleurs, Yamasaki (1931) étudiant les étapes de la fermentation du maltose (formation de méthylglyoxal) montre que le système fermen-

tatif du maltose n'est pas différent de celui du glucose. Cette action particulière observée par Trautwein est accidentelle, spéciale à certaines espèces ou races de levures qui ont une affinité spéciale pour le maltose. Ce phénomène de nature fermentative n'a rien à voir avec nos observations, qui concernent un phénomène de croissance, non pas particulier à une race, mais beaucoup plus général (voir chapitre suivant).

### 9. Discussion des résultats.

Divers auteurs ont examiné — à la suite d'observations dues généralement au hasard — l'influence du degré de pureté du sucre sur les microorganismes.

*Glucose* : Lino ssier (1919) observe qu'avec le glucose de commerce (impur), les cultures d'*Oïdium lactis* présentent un poids sec de champignon plus élevé que celles qui sont effectuées sur du glucose pur. Malheureusement Lino ssier ne cherche pas à isoler le facteur accessoire de croissance auquel il fait allusion et se contente de faire des expériences, contrôles avec des extraits autoclavés de choux réputés riches en vitamines; il observe une action accélérante pour *Oïdium* et *Penicillum*, surtout si auparavant le champignon a été placé dans des conditions de culture défavorables.

On ne peut tirer aucune conclusion après l'emploi d'une substance et d'un mélange aussi complexe que l'extrait de chou.

Nous avons fait avec *Phycomyces* des essais comparatifs en employant soit le glucose de commerce (B. D. H.) soit le glucose purissimum (B. D. H.). Les résultats, tant en ce qui concerne le développement végétatif que la sexualité furent très médiocres avec les deux sucres.

*Saccharose* : Willaman et Olsen (1923) observent que le saccharose purifié à l'alcool à 95°, puis trois fois à l'alcool à 80° devient de moins en moins favorable à la croissance de la levure. Ces auteurs concluent à la présence d'une impureté soluble dans l'alcool à 80° et cherchent à montrer son analogie avec le bios de Wildiers.

*Lactose* : C'est en partant du lactose du commerce dont ils comparent l'action à celle du lactose purifié que Hopkins et ses collaborateurs établissent l'existence d'un facteur de croissance indispensable au rat. Le lactose de commerce accélère d'une façon marquée la croissance de cet animal tandis que le lactose purifié n'a plus d'action. Avec le lactose de commerce, on introduit une faible dose supplémentaire d'azote (0,2 à 0,34 ‰).

Ce sont ces faits qui ont servi de base à la notion de facteur dit hydrosoluble ou vitamine B.

*Maltose* : Rose en 1910, Lindner et Saito en 1910—1911, le premier avec *Endomyces*, les seconds avec diverses levures, cons-

tatent qu'avec de nombreux milieux synthétiques à base d'asparagine, ces champignons peuvent assimiler fortement le maltose, mais pas le glucose qui est pourtant fermenté. Les auteurs ne peuvent expliquer le fait qui semble paradoxal.

En 1912, Lindner détermine la teneur en azote du maltose Kahlbaum qu'il fixe à 0,25 %; il ne croit pas que cette quantité d'azote joue un rôle direct important mais qu'elle facilite l'assimilation de l'azote atmosphérique. Il constate que les cultures avec urée + maltose Kahlbaum, réussissent mieux que celles avec urée + glucose.

Kluyver (1913) reprend la question avec *Endomyces Magnussi*, *Saccharomyces exigus*, *Schizosaccharomyces Pombe* et des levures du lait et retrouve les mêmes faits soit en utilisant l'asparagine, soit en remplaçant celle-ci par une autre source azotée; il pèse les levures qui ont crû dans la solution d'Hayduck (même composition minérale que le milieu de Coons) et constate par exemple que les levures de lait qui, sur glucose, fournissent un poids de matière de 1 gramme, atteignent sur maltose, le chiffre de 72 grammes. Kluyver part de l'idée des infiniments petits chimiques de Bertrand et suppose qu'une impureté se trouve jointe au maltose. Il constate qu'après deux cristallisations successives (selon Soxhlet), le maltose de Kahlbaum ne possède plus de supériorité. Le maltose de Merck ne la possède pas non plus; il s'agit donc d'une propriété particulière au maltose de Kahlbaum. L'auteur fait des analyses d'azote et trouve que le maltose Kahlbaum contient 0,22 % d'albumine tandis que le maltose purifié n'en contient que 0,04 %; il attribue une importance qualitative à ce supplément d'azote apporté.

Lindner a, en 1913, une intéressante discussion avec Kluyver; il émet l'idée d'une substance analogue au bios de Wildiers en montrant, cependant, que le bios de Wildiers se dissout dans l'alcool à 80°, tandis que ce même alcool, précipite, selon Kluyver, l'impureté du maltose.

Kita (1914) ne croit pas à l'hypothèse de Kluyver et après des expériences quantitatives, pense qu'au maltose de Kahlbaum, se trouve joint un corps inconnu agissant à la manière de l'oryzantine découverte en 1912 par Susuki et ses collaborateurs et qui fonctionnerait comme catalyseur de l'assimilation. Kita n'a pas approfondi cette hypothèse.

Le problème est discuté par Kluyver au chapitre II de sa thèse (1914).

De toute façon, le problème est posé. Aucun auteur ne l'a résolu et n'a étudié la nature et les caractéristiques de cette substance inconnue.

Il nous semble donc que nos recherches ont placé le problème dans la situation qu'il doit avoir aujourd'hui, considéré du point de vue des vitamines.

L'étude de l'impureté du maltose de Kahlbaum ne constitue qu'un point de départ; sa valeur en soi est limitée; mais elle permet d'introduire expérimentalement le problème de l'action des vitamines sur la sexualité des êtres inférieurs, question singulièrement plus générale.

### 10. Conclusions.

1. Les conditions de formation des zygotes sont précisées en ce qui concerne l'action du malt, de l'agar, des sucres ainsi que l'action inhibitrice de la gélatine.

2. L'action particulière du maltose Kahlbaum est constatée et par une étude des caractères chimiques de divers échantillons de ce sucre nous concluons à la présence dans le maltose Kahlbaum d'une impureté, probablement azotée, et dont les caractéristiques sont étudiées et la nature vitaminique supposée.

3. L'action d'un concentré de vitamine B. préparé à partir de la levure de bière et contenant les divers facteurs du groupe B, est étudié; son action accélérante sur la sexualité de *Phycomyces* est extrêmement forte. Cela rend plausible l'hypothèse d'une substance de nature vitaminique jointe au maltose Kahlbaum.

4. Le mode d'action de cette substance est étudié; elle semble, dans les conditions de nos expériences, rendre le champignon apte à résister à l'inhibition causée par une très forte dose d'asparagine; en même temps, nous mettons en évidence la relativité de l'action de l'impureté qui se manifeste dans les conditions données; avec des milieux sans substances azotées, tous les maltoses et divers autres sucres, donnent des cultures semblables, avec une faible récolte de zygotes. Mais avec une certaine dose d'asparagine, l'action particulière du maltose Kahlbaum s'affirme avec intensité, alors que dans les mêmes conditions tous les autres échantillons de maltose — ainsi que d'autres sucres — ne produisent pas ou que très peu de zygotes.

5. La nature de cette substance est difficile à préciser; elle ne semble pas être un biocatalyseur de fermentation (co-zymase, facteur Z), mais se rapprocher du bios (vitamine D, ou d'utilisation cellulaire). Nous ne pouvons l'assimiler définitivement à l'un de ces corps, il s'agit peut-être d'une substance différente. Son action sur la sexualité est directe ou non (par l'intermédiaire du développement végétatif).

---

### Bibliographie.

- Burgeff (H.): Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens*. I. «Flora.» 1914, t. 107, p. 209.
- Coons (G. H.): Factors involved in the growth and the pycnidium formation of *Pleodomus fuscomaculans*. «Journal of agricultural Research», 1916, t. 5, p. 713.
- Kita (G.): Zur Frage der Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. «Zeitschrift für Gärungsphysiologie», 1915, t. 4, p. 321.
- Kluyver (A. J.): Biochemische Suikerbepalingen. Thèse, Leyde, 1914.
- idem.: Die Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. «Biochemische Zeitschrift», 1913, t. 52, p. 486.
- Linossier (G.): Les vitamines et les champignons. «C. R. Soc. biol. Paris», 1919, t. 82, p. 381. «C. R. Soc. biol.», 1920, t. 83, p. 346.
- Lindner (P.) et Saito: Assimilierbarkeit verschiedener Kohlenhydrate durch verschiedene Hefen. «Wochenschrift für Bräuerei», 1910, t. 27, p. 509.
- Lindner (P.): Neuere Ergebnisse bei Assimilationsversuchen mit verschiedenen Hefen und Pilzen. «Zeitschrift Angew. Chemie.», 1912, t. 25, p. 1175. cf. «Chemiker Zeit.», 1912, t. 36, p. 635.
- idem.: Assimilierbarkeit verschiedener Kohlehydrate durch verschiedene Hefen. 1. Nachtrag zu der gleichlautenden Abhandlung von Lindner und Saito in «Wochenschrift für Bräuerei», 1910, n° 41. «Wochenschrift für Bräuerei», 1911, t. 28, p. 561.
- idem.: Bemerkung zu A. J. Kluyvers Mitteilungen über die Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. «Bioch. Ztsch.», 1913, t. 56, p. 163.
- idem.: Zur Frage der Assimilation des Luftstickstoff durch Hefen und Pilze. «Wochenschrift für Bräuerei», 1913, t. 30, p. 589.
- Nitzescu (J. J.): L'action de la chaleur humide (autoclave) et de la chaleur sèche (étuve) sur le facteur B. «C. R. Soc. biol. Paris», 1923, t. 89, p. 1244.
- Orban (G.): Untersuchungen über die Sexualität von *Phycomyces nitens*. «Beihefte z. Botanischen Centralblatt», 1919, t. 36, p. 1
- Osborne (T. B.) et Wakeman (A. J.): Extraction and purification of the brewers yeast. «Journ. Biol. Chem.». 1919, t. 40, p. 383.
- Randouin (L.) et Lecoq (R.): Existe-t-il dans la levure de bière un facteur hydrosoluble, thermostable et alcalinostable nécessaire à la vie, distinct des vitamines B, d'utilisation nutritive et antinévritique? «C. R. Soc. biol. Paris», 1928, t. 99, p. 586.
- Reader (V.): The relation of the growth of certain micro-organisms to the composition of the medium. III. The effect of the addition of growth promoting substances to the synthetic medium on the growth of *Streptothrix corallinus*. «Bioch. Journ.», 1923, t. 22, p. 434.
- Rose: Beiträge zur Morphologie und Physiologie des *Endomyces Magnussi*. «Wochenschrift für Bräuerei», 1910, t. 27, p. 167.
- Sherman (H. C.) and Grose (M. R.): A quantitative study of the destruction of vitamin B. by heat. «Journal Am. Chem. Soc.», 1923, t. 45, p. 2728.
- Schopfer (W. H.): Recherches sur la sexualité des champignons. «Bulletin Soc. botanique de Genève», 1928, 2<sup>me</sup> série, t. 20, p. 149.
- idem.: Etude de l'influence du maltose sur la croissance. «Actes Soc. Helv. Sc. Nat.», 1930, 111<sup>me</sup> session, p. 312.
- idem.: Sur une substance active jointe au maltose. Action physiologique. «C. R. Soc. Phys. Hist. Nat.», 1930, t. 47, p. 101.
- idem.: Etude de l'influence des extraits de levures et des concentrés de vitamines B. sur la sexualité d'un champignon. «C. R. Soc. Phys. Hist. Nat.», 1931, t. 48, p. 105.

- idem.: Sur l'adsorption de la substance activant le développement d'un champignon. « Actes Soc. Helv. Sc. Nat. », 1931, 112<sup>me</sup> session, p. 328.
- Susuki (U.), Schimura (T.), Odake (S.): Ueber Oryzanin, ein Bestandteil der Reiskleie und seine physiologische Bedeutung. « Bioch. Zeitschr. », 1912, t. 43, p. 89.
- Trautwein und Wassermann: Die Gärleistungen der Hefen der ersten Untergruppe der Gattung *Saccharomyces*. « Bioch. Zeitschr. », 1929, t. 215, p. 293.
- Wildiers (E.): Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. « La Cellule », 1901, t. 18, p. 311.
- Willaman (J.) et Olsen (A. G.): The Bios requirement of bakers yeast. « Journ. of. biol. Chemistry », 1923, t. 55, p. 815.
- Jamasaki (J.): Das zymatische System von *Saccharomyces Johannisberg*. « Bioch. Zeitschr. », 1931, t. 228, p. 127.
- Yoshimura (K.): Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime. « Bioch. Zeitschr. », 1911, t. 31, p. 221.
-