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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 41 (1932)

Heft: 2

Artikel: Recherches sur le facteur de croissance contenu dans le germe de blé

Autor: Schopfer, W.-H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-27755

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Recherches sur le facteur de croissance contenu dans le germe de blé.

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

Manuscrit reçu le 20 septembre 1932.

Le germe de blé constitue une source de vitamines à laquelle le physiologiste fait souvent appel. Il est riche en vitamines hydrosolubles, B 1 et B 2, ainsi qu'en liposolubles, A et D. Il constitue d'autre part l'une des matières les plus avantageuses pour l'obtention de la vitamine E, antistérilité.

Dans de précédentes recherches (1930—1932), nous avons montré qu'un champignon, *Phycomyces blakesleeanus,* est extrêmement sensible à un facteur dont nous avons supposé la nature vitaminique. Sur un milieu rigoureusement synthétique, agarisé, la croissance est faible et la sexualité ne se manifeste que faiblement, parfois pas du tout. Si à ce milieu, on ajoute le facteur auquel nous faisons allusion, le développement végétatif est intense, parfois décuplé; la sexualité se manifeste d'une façon si forte qu'il se forme plus de 1000 zygotes, alors que le témoin n'en produit aucune ou que très peu. Le facteur incriminé se trouve joint à certains échantillons de maltose du commerce, réputés cependant parfaitement purs; on peut le séparer de ce sucre; on l'obtient également à partir de la levure et de ses divers extraits; sans qu'il nous ait été possible de l'obtenir à l'état pur, nous avons pu le concentrer et préciser quelques-uns de ses caractères : nature probablement azotée, grande thermostabilité, adsorbabilité complète par le noir animal.

Dans le présent travail, nous chercherons à préciser la nature de ce facteur en faisant appel à une autre source : le germe de blé dans lequel nous supposons que ce facteur existe.

Obtention du germe de blé pur. Préparation des divers extraits.

Nous partons de l'ensemble des déchets obtenus à partir des premiers cylindres de la minoterie. Cet ensemble est constitué par des débris divers, glumes, sons, quelques gruaux, des semoules et surtout des germes, que l'on reconnaît aisément par les taches grasses qu'ils produisent sur le papier lorsqu'on les écrase avec le doigt.

Par des tamisages successifs, en utilisant des étamines à mailles de dimensions variées, nous obtenons tout d'abord les germes et les matériaux plus petits; un nouveau tamisage nous permet d'obtenir presque exclusivement les germes.

Une quantité connue de ces derniers est placée dans de l'eau distillée et portée à l'autoclave (120° pendant 10 minutes). Après filtration sur coton, l'extrait obtenu, épais et trouble, est traité avec de l'éther, ce qui enlève une grande partie des lipides. L'adjonction de 4 à 6 volumes d'alcool à 95° précipite une grande partie des protides; après filtration, le liquide obtenu, clair légèrement jaunâtre, est concentré sous le vide; l'élimination totale de l'alcool permet de revenir au volume primitif; le liquide est alors jaune plus foncé (jaune ocre doré); nous y ajoutons un volume d'éther, ce qui permet de le dégraisser complètement et en même temps assure sa conservation (à l'abri de l'air et de la lumière).

Parfois, nous avons procédé à l'élimination des lipides au début, sur les germes secs, au Soxhlet. Les mêmes opérations que précédemment amènent à l'extrait aqueux cité plus haut. Les matières grasses obtenues, après élimination de l'éther constituent une huile jaune verdâtre, épaisse, qui sera utilisée également (extrait gras).

Dans un cas nous avons extrait le facteur actif au Soxhlet à l'alcool absolu, et à partir des germes secs et dégraissés. Dans un autre cas, nous sommes partis de la polissure de riz, traitée de la même façon que le germe.

L'espèce utilisée est le *Phycomyces blakesleeanus Bgff.*, n° 7 (+) et n° 4 (—) de la collection du Professeur Burgeff. Dans un cas, nous nous sommes servi de deux souches (+ et —) envoyées par le Professeur Blakeslee.

Le milieu utilisé est celui de Coons : maltose puriss. 10 g. %, asparagine 0.50 à 1 g. ‰, $MgSO^4$ 0.50 g. ‰, KH^2PO^4 2 g. ‰, agar très pur 3 g. ‰. Le milieu est stérilisé pendant 15 minutes à 115°, avec l'extrait de germes de blé. Un témoin, préparé exactement dans les mêmes conditions que les autres expériences, indique si le milieu sans extrait est réellement inactif. Un témoin est valable avant tout pour la série à laquelle il est joint et avec laquelle il a été préparé.

Les ensemencements se font avec des souches fraîchement repiquées; l'âge de la souche, son état d'épuisement et de dégénérescence ont une grande importance sur la marche des expériences qui, ne l'oublions pas, doivent être comparées entre elles.

Les expériences se font à la lumière et à 18—20°, dans des vases de Pétri, avec 50 cc. de milieu.

Les auteurs qui voudront répéter nos expériences devront le faire avec les mêmes souches et en suivant exactement les conditions indiquées. Des détails tels que la dose d'asparagine ou d'agar peuvent modifier complètement une expérience. Les caractéristiques observées sont le développement végétatif et surtout le nombre et l'état des zygotes. Les chiffres indiqués dans les tableaux se rapportent au nombre

de zygotes. Le nombre maximum de copulations, pour une culture faite dans les conditions indiquées, est atteint après 8 à 15 jours. Pour chaque expérience nous indiquerons la dose exacte et la provenance du glucide utilisés.

Expérience 1.

Extrait aqueux simple, total, non dégraissé, protides non précipités.

50 cc. d'extrait correspondent à 50 g. de germes secs. Les quantités d'extrait sont à rapporter à 50 cc. de milieu.

Asparagine : 0.5 g. ⁰/₀₀.

	témoin	1/2	1	2	4 cc. d'extrait
6e jour .	0	40	25	150	300
9e » . .	0	750	500	700—720	650—700

Expérience 2.

Comme 1., mais protides précipités par l'alcool; 10 cc. d'extrait correspondent à 50 g. de germes secs. Cet extrait contient 0.225 g. de résidu sec, soit 0.00225 g. par 1/10 de cc. Cette quantité minimum est ajoutée à 50 cc. de milieu, ce qui fait 0.000045 g. de substances sèches par cc. de milieu.

	témoin	1/10	1/2	1	2 cc. d'extrait
6e jour . .	0	54	350	250—300	200
9e » . .	0	650	800—850	700—750	650—700

Action extrêmement forte déjà à partir de 1/10 de cc. Dans les deux expériences, mycélium aérien presque nul pour les témoins, de plus en plus dense jusqu'à la quantité max. d'extrait utilisée.

Les lignes de zygotes sont denses, larges; toutes les zygotes ne sont pas encore noires et complètement formées.

Expérience 3.

Le précipité de protides, obtenu à partir des germes dégraissés, est conservé et séché à l'exsiccateur, sans avoir été l'objet d'une purification. Les quantités indiquées sont à rapporter à 50 cc. de milieu.

Même milieu que pour 1 et 2.

	témoin	1/10	2/10	4/10 g. de précipité
6e jour . . .	0	4	25	100
9e » . . .	0	325	550—600	700

Le précipité a donc entraîné avec lui une petite quantité de facteur actif, peu certainement, car il ne faut pas oublier que nous ajoutons ici une substance solide. Pour obtenir le même effet que $^1/_{10}$ de cc. d'extrait contenant 0.000045 g. de résidu sec, il faut ajouter dans l'expérience 3 environ 0.3 g. de substance sèche. Il est donc probable que ce n'est pas le protide lui-même qui est actif. D'ailleurs un lavage prolongé avec de l'alcool dilué le rend presque inactif.

Expérience 4.

Extrait dégraissé; protides précipités.

Résidu sec 9.88 g. %, soit pour $^1/_{10}$ cc. ajoutés à 50 cc. de milieu : 0.0001976 g. par cc. de milieu.

Maltose Merck pur crist. 8 g. %.

Asparagine 0.5 g. %.

	témoin	$^1/_{10}$	1 cc. d'extrait
9e jour	200	700—750	1100—1200

Mycelium aérien beaucoup plus développé que le témoin, chez lequel il est presque nul. Ligne de zygotes extrêmement dense. Le nombre de zygotes plus élevé correspond probablement à une quantité de substance sèche, donc de facteur actif plus élevée. Les lipides ne semblent donc pas intervenir. Dans toutes les expériences qui suivront, les extraits seront privés de leurs lipides et protides.

Expérience 5.

Détermination d'une limite d'action.

Extrait aqueux à 2.64 g. % de substance sèche.

Maltose Merck pur crist. 8 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

	témoin	$^1/_{200}$	$^1/_{100}$	$^1/_{50}$	$^1/_{10}$ cc. d'extrait
5e jour .	75 et 134	120	94	190	245
9e » .	200 et 260	266	280	450	540

Si le témoin était à 0 zygote, nous pourrions considérer comme limite inférieure, l'expérience à $^1/_{200}$ cc.; comme ce n'est pas le cas ici, nous sommes obligé par prudence de prendre l'expérience à $^5/_{100}$ cc. Cette limite pourrait certainement être abaissé encore à $^3/_{100}$ ou $^4/_{100}$ de cc.

$^5/_{100}$ cc. d'extrait à 2.64 g. ‰ de substance sèche, ajoutés à 50 cc. de milieu, correspondent à 0.0000264 g. de substance sèche par cc. de milieu. Cette quantité est bien inférieure à celle du constituant nutritif le moins abondant du milieu.

Maltose	0.08	g. par cc.
KH^2PO^4	0.002	g. » »
$MgSO^4$	0.0005	g. » »
Asparagine	0.0005	g. » »
Substance de l'extrait . .	0.0000264	g. » »

L'asparagine qui est le constituant nutritif le moins abondant du milieu et dont de très faibles variations suffisent pour changer visiblement l'allure de la culture, se trouve donc à une dose presque 20 fois plus élevée que la substance sèche de l'extrait ajouté.

Il va de soi que la substance sèche de nos extraits est loin de représenter le facteur actif supposé à l'état pur : les limites inférieures pourront encore être abaissées par une purification plus poussée.

Expérience 6.

Action possible d'un élément inorganique agissant comme infiniment petit chimique.

3 g. de germes secs sont calcinés. Les cendres sont ajoutées à 50 cc. du même milieu que pour l'expérience 5.

	témoin	2/10	5/10 g. cendres
9e jour	150	85	130

Mycelium aérien très faible, beaucoup plus que dans l'expérience précédente.

Il ne semble donc pas que, dans les limites de précision de cette expérience, une action doive être attribuée à un infiniment petit chimique, en tant naturellement que cette expérience garde une signification. Sans que nous puissions l'éliminer d'une façon radicale, cette hypothèse ne sera pas retenue pour l'instant.

Expérience 7.

Extraction de la substance active par l'alcool absolu.

Les extraits étaient jusqu'à maintenant hydro-alcooliques. Nous essayons d'extraire le facteur actif par l'alcool absolu (99.7°) en traitant au Soxhlet 20 g. de germes secs et dégraissés. Le liquide obtenu est jaune, trouble; l'alcool est ensuite évaporé et le résidu repris par l'eau; c'est ce dernier liquide qui est utilisé. Il peut être rendu clair par l'adjonction d'un peu d'alcool et d'éther. Addition de ½ cc. d'extrait à 50 cc. de milieu.

	témoin	extrait normal	extrait Soxhlet alcool
9e jour	0	500	450

Très fort mycelium aérien; ligne de zygotes large et dense. Beaucoup de zygotes avortées.

Il semble donc possible d'extraire le facteur actif par l'alcool absolu.

Expérience 8.

Action de l'extrait adjoint à des milieux contenant d'autres glucides que le maltose.

Extrait à 9.8 g. % de résidu sec. Adjonction de ½ cc. d'extrait à 50 cc. de milieu.

	Glucose		Saccharose		Lactose		Galactose	
	sans	avec	sans	avec	sans	avec	sans	avec
8e jour	110	1000 1200	95	750	7	145	15	100
	1	2	3	4	5	6	7	8

En 1, 3, 5 : peu de mycelium aérien.
En 7 : pas de mycelium aérien.
En 2, 4 : mycelium aérien très dense; ligne de zygotes très large.
En 6 : moins qu'en 2 et 4.
En 8 : large ligne de zygotes; presque toutes sont avortées.

Le saccharose et le galactose sont des produits purs Siegfried. Le glucose est anhydre puriss. Siegfried. Le lactose est puriss. (poids atomique intern. 360, 192), B. D. H.

On voit donc que pour tous les sucres utilisés, le milieu étant complet et azoté, l'adjonction de l'extrait produit une très forte élévation dans l'intensité des manifestations des affinités sexuelles. Cependant, on ne peut pour le lactose et le galactose, établir un rapport entre les nombres de zygotes apparues sur les milieux avec et sans extrait; la quantité totale de zygotes est trop faible et peut être comprise dans la limite des variations observables. Nous ne pouvons donc employer pour nos expériences que les maltose, glucose et saccharose.

Expérience 9.

Action de la teneur en asparagine sur l'action des extraits.

Extrait à 9.8 g. de résidu sec %.
Maltose Merck crist. pur 8 g. %.
Asparagine 1 g. ‰ (au lieu de 0.5).

	témoin	1/10	1/2	1 cc. d'extrait
8e jour . .	14	900—950	850—900	1000—1050

Le témoin a un mycelium presque inexistant; aspect caractéristique des cultures avec forte dose d'azote (asparagine), qui, comme nous l'avons montré, exerce à partir d'une certaine limite, une action inhibitrice.

Pour les cultures avec extrait, mycelium extrêmement dense; elles sont parmi les plus fortement développées que nous ayons obtenues jusqu'ici. L'idée que nous avions précédemment émise est confirmée : tout se passe comme si l'adjonction de ce facteur actif permet au champignon de résister à des conditions défavorables; l'inhibition provoquée par un excès d'azote est non seulement empêchée, mais le développement végétatif est plus intense qu'avec une culture ordinaire.

Expérience 10.

Adsorption du facteur actif par le noir animal.

Une quantité connue d'extrait est traitée à ébullition avec du noir animal puriss. de Merck (lavé préalablement plusieurs fois jusqu'à ce que les eaux de lavages soient neutres). Le liquide est jaune brun; lorsqu'il a été traité, il s'écoule complètement décoloré; il est ramené au même volume qu'avant le traitement.

Maltose pur crist. Merck 8 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

	traité			non traité		
	témoin	1/10	1 cc.	témoin	1/10	1 cc.
7e jour . .	75	86	76	75	600—650	900—1000
10e » . .	90	100	96	90	900	1000—1100
	Mycelium aérien très peu développé.			Mycelium aérien très dense. Ligne de zygotes large et régulière.		

Comme pour le maltose de Kahlbaum et les extraits de levures, le noir animal agit en adsorbant totalement le facteur actif intervenant ici.

L'adjonction au milieu de petites doses de noir animal ayant adsorbé la substance active n'a pas donné de résultats satisfaisants. De même, nous n'avons pu réussir l'élution de la substance. Ce point sera repris plus tard.

Expérience 11.

Adsorption du facteur actif par la terre à foulon.

10 cc. d'extrait dégraissé sont traités à l'ébullition avec de la terre à foulon de Poulenc. Après filtration, l'extrait n'est pas décoloré.

Glucose puriss. Siegfried 10 g. %.

Asparagine 1 g. ‰.

	témoin	extrait traité	extrait non traité
9e jour	0	650	500

Très fort mycelium aérien; un certain nombre de zygotes avortées dans la ligne qui est large et dense.

Ce caractère de non-adsorption par la terre à foulon peut, joint à d'autres caractères, constituer un critère en ce qui concerne l'identification de notre substance.

Expérience 12.

Essai de destruction du facteur actif par les rayons ultra-violets.

Extrait à 2.64 g. % de résidu sec.

Glucose puriss. Siegfried 10 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

Les extraits, dégraissés ou non, sont placés dans un Pétri de 10 cm. (en couche mince) et exposés pendant 1 heure aux rayons ultra-violets non filtrés d'une lampe. Nous n'observons pas de fluorescence particulière. Pour compenser l'évaporation, nous ajoutons de temps à autre un peu d'eau distillée.

	extrait non dégraissé		extrait dégraissé	
	non traité	traité	non traité	traité
10e jour	510	560	500	520

Très fort développement végétatif; ligne de zygotes large et dense; un certain nombre de zygotes avortées.

Dans les conditions de nos expériences, il n'y a donc pas d'action destructrice des rayons U-V.

Expérience 13.

Action de l'extrait aqueux de polissures de riz.

50 g. de polissures sont traitées comme le germe de blé pour obtenir l'extrait aqueux privé de protides et de lipides.

Maltose Merck crist. pur 10 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

Les quantités sont à rapporter à 100 cc. de milieu.

a) Polissures non traitées, brutes (Souches Blakeslee).

	témoin	0,01	0,02	0,05 g.
10e jour	190	300	300	500—600 350—400

Avec 0.05 g., mycelium aérien plus dense qu'avec les autres termes de l'expérience.

b) Extrait aqueux de polissures (Souches Burgeff).

	témoin	1/10	1/2	1 cc.
9e jour	65	215	1100—1200	1350

Avec 1 cc., le mycelium est très développé; la ligne de zygotes est l'une des plus denses que nous ayons observées jusqu'ici.

Expérience 14.

Action de la chaleur sur le facteur actif.

a) Chaleur humide.

Toutes les expériences décrites jusqu'à maintenant ont été effectuées avec des extraits chauffés à 115—120°, pendant 15 minutes; le facteur actif semble donc relativement thermostable.

b) Chaleur sèche.

La chaleur sèche nous permet de graduer plus facilement la température des diverses expériences. Nous avons utilisé le dispositif suivant : une éprouvette ordinaire, contenant une quantité connue de substance à étudier, plonge dans un tube plus fort, qui, lui-même, baigne dans un bain de paraffine chauffé au degré voulu. Le thermomètre plonge dans la première éprouvette et est en contact direct avec la substance; nous pouvons ainsi surveiller très exactement la température atteinte par la substance elle-même; parfois, nous faisons le vide (15 mm.). Pendant les premiers instants de chauffe, le liquide qui se trouve dans l'éprouvette interne en très petite quantité, s'évapore et la chaleur n'agit plus que sur la substance sèche. Comme nous soumettons à la chaleur la quantité exacte d'extrait qui sera nécessaire pour un essai, il nous suffit, le temps de chauffe désiré étant atteint, de dissoudre le résidu sec dans un peu d'eau et de l'ajouter au milieu (50 cc.).

Extrait à 9.8 g. % de résidu sec.
Maltose Merck crist. pur 8 g. %.
Asparagine 0.5 g. ‰.

Les milieux subissent encore une stérilisation après l'adjonction de l'extrait chauffé.

	témoin sans extrait	témoin + 1 cc. extrait	130°, 15 min. (vide)	135°, 10 min. (vide)	140°, 30 min. (air)	155°, 30 min. (vide)
10e jour	12	950—1000	800—850	600	600—650	600
	1	2	3	4	5	6

En 1 : pas de mycelium aérien.

En 2 : très fort mycelium aérien.

En 3 à 6 : mycelium aérien assez dense, mais moins que le 2me témoin; ligne de zygotes large, moins que le témoin 2.

Si nous prenons comme unique critère le nombre de zygotes, nous constatons que, malgré la température élevée atteinte, la diminution d'activité est assez faible : 10 à 20 % à 130°, 15 min., et 40 % à 155°, 30 min. Il n'y a pas de différence appréciable entre le chauffage à l'air libre et sous le vide.

Comme nos extraits contiennent encore passablement de glucides, le chauffage produit un brunissement et un début de caramélisation; le milieu auquel cet extrait est ajouté est coloré en brun; l'expérience n'en est pas modifiée puisque la totalité de la substance chauffée est redissoute dans l'eau.

Expérience 15.

Action des alcalis combinée à celle de la chaleur.

a) Des extraits de germe de blé et de polissure de riz sont chauffés pendant 1 heure à 130° avec leur volume de soude N. Après refroidissement, neutralisation avec HNO^3 concentré. Nous avons choisi cet acide afin que le sel formé ne soit pas toxique. Avant chaque expérience, la réaction des extraits est soigneusement vérifiée.

Glucose puriss. Siegfried 10 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

	témoin sans extrait	témoin HNO^3+NaOH dans eau	blé		riz	
			non traité	traité	non traité	traité
10e jour	0	0	520	320	500	170

Beaucoup de zygotes avortées dans la ligne qui est large et dense. Malgré une diminution d'activité, forte surtout pour la polissure de riz, le facteur actif manifeste encore son influence. On peut donc le considérer comme relativement alcalisable.

b) Des extraits de germe de blé, dégraissés ou non, sont chauffés pendant 20 minutes à 115°, avec quelques gouttes de soude N. Neu-

tralisation avec HNO^3. Ces extraits sont ajoutés au taux de 1 cc. à 50 cc. de milieu.

Maltose crist. pur. Merck 8 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

	témoin sans extr.	témoin + extr. non chauffé	témoin HNO^3+NaOH dans eau	extraits traités	
				non dégraissé	dégraissé
10e jour . .	65	1200—1250	75	700—750	850—900

La plus forte diminution d'activité atteint l'extrait non dégraissé : 41.6 %, en tenant uniquement compte du nombre des zygotes.

Cette forte thermostabilité ne doit pas nous étonner; on sait que la vitamine B^1, relativement peu thermostable — beaucoup moins que la B^2 et le bios — résiste beaucoup mieux à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide; la température de 120°, en milieu humide, détruit presque complètement le facteur B contenu dans les graines, tandis que la même température, mais en milieu sec, n'a pas d'action (Nitzescu 1923).

Expérience 16.

Action de l'extrait gras.

Pour terminer le cycle de ces expériences, il est indispensable d'expérimenter l'action des lipides extraits du germe, qui en est riche. On sait que ce sont eux qui contiennent la vitamine E, antistérilité. Notre idée n'est pas d'expérimenter l'action de ce facteur sur la sexualité du champignon, mais bien celle des matières grasses. L'huile obtenue au Soxhlet est émulsionnée dans le milieu agarisé; elle est ajoutée à la pipette, légèrement chauffée, après la stérilisation, afin d'éviter une saponification, le milieu étant encore tiède. Malgré le brassage, elle s'accumule en plus grande quantité à la surface. Au microscope, les gouttelettes, irrégulièrement disposées, sont bien visibles.

Maltose crist. pur. Merck 8 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

Les quantités d'huile sont à rapporter à 50 cc. de milieu.

	témoin	0,06	0,12	0,24	0,48 cc.
8e jour . .	16	155	290—300	300	300—320

Ligne de zygotes peu dense; mycelium aérien touffu, surtout dans les deux dernières expériences.

Il n'y a pas de différence de pH appréciable au cours des expériences.

Une action favorisante est indiscutable. Devons-nous l'assimiler à une action de nature vitaminique ? Il se peut que l'huile obtenue

au Soxhlet ait entraîné avec elle des traces de facteur actif, qui, normalement, doivent se retrouver dans l'eau. Mais nous pensons ici avant tout à une action alimentaire directe; il faut se rappeler que l'huile ajoutée est pure, concentrée; la quantité nécessaire pour qu'une action se fasse sentir est beaucoup trop forte, mise en rapport avec l'effet obtenu, pour que l'on puisse invoquer une action vitaminique; il suffit de comparer les quantités; avec l'huile, 0.24 cc. de substance pure donnent 300 zygotes, et avec l'extrait aqueux, $^1/_{10}$ de cc., contenant 0.0000264 g. de substance sèche, produit 800 zygotes.

Nous considérons donc l'action des graisses comme étant de nature alimentaire, directe, favorisant le développement végétatif et par là la sexualité. Cette utilisation des matières grasses est intéressante à mettre en relation avec le fait que *Phycomyces* fut signalé pour la première fois sur des matières grasses. Malgré que l'intervention d'un facteur actif liposoluble ne se justifie pas ici, nous devons tout de même rappeler que l'on parle actuellement d'un bios-lécithine, agissant sur le développement des levures (Ide, 1931). Nous avons effectué un essai préliminaire en ajoutant à un milieu constitué par 10 g. % de maltose Schuchardt crist. pur. et 0.5 g. ‰ d'asparagine, une petite quantité de lécithine (provenant du jaune d'œuf, Kahlbaum). Souches Blakeslee.

	témoin	avec lécithine	
10e jour	5	1) 15—17	2) 20

Le témoin a un mycelium souterrain blanc et un très faible mycelium aérien. Avec la lécithine, mycelium aérien plus élevé, jusqu'à 15—20 mm.; coloration légèrement jaunâtre.

Nous ne constatons pas, dans les conditions de nos expériences, une action accélérante sur la sexualité.

Expérience 17.

Essai de précipitation du facteur actif.

Les techniques de précipitation et d'entraînement du facteur actif permettent sa concentration; elles sont fréquemment utilisées en physiologie animale. En ce qui concerne les microorganismes, elles mettent l'expérimentateur aux prises avec une difficulté : la nécessité d'éliminer complètement toute trace du corps ayant servi à la précipitation. Beaucoup de microorganismes sont extrêmement sensibles à l'action de traces de métaux (fer, cuivre, zinc, etc.) et les résultats obtenus avec une substance active contenant encore une trace de métal, accélérant le développement, ou, toxique et l'inhibant, n'ont plus pour nous de signification précise.

Nous avons choisi l'acide phosphotungstique, éliminé ensuite par la baryte.

germes de blé secs
+ eau
I [extrait aqueux total]
+ alcool ⟶ protides
+ éther ⟶ lipides
évaporation de l'alcool
concentration
II [extrait aqueux final]
20 cc. extrait + 20 cc. acide phosphotungstique 5 %

précipité blanc beige
dissolution
+ $Ba(OH)^2$
élimination du précipité
III [liquide actif]

filtrat
+ $Ba(OH)^2$ ⟶ précipité bleu
IV [liquide restant jaunâtre]

Les liquides III et IV sont ramenés à 20 cc.

Le précipité formé par l'acide phosphotungstique ayant entraîné entre autres la substance active est redissous, puis traité par la baryte; celle-ci décompose le précipité, libère la substance active qui reste en solution : c'est ce liquide que nous utilisons. Nous recueillons également le filtrat, afin d'observer si une certaine quantité de substance active n'est pas restée en solution.

Dans un premier essai, nous ne trouvons au liquide final presque aucune activité. Après une nouvelle tentative, nous obtenons les résultats suivants :

Glucose puriss. Siegfried 10 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰.

témoin sans extrait	témoin + extr. non traité				liquide IV				liquide III			
	1/10	1/2	1	2	1/10	1/2	1	2	1/10	1/2	1	2 cc.
198	400	480	425	450	254	300	390	500	290	273	400	450
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

En 1 : faible mycelium aérien; zygotes en ligne très espacée.
En 2 à 13 : mycelium aérien dense, à peu près également partout.
En 6, 7, 10, 11 : ligne de zygotes espacée.
Ailleurs ligne dense.

On voit que le liquide final, obtenu dans les conditions décrites, possède une certaine activité se manifestant après $^1/_{10}$ cc.; une partie de la substance doit être restée dissoute puisque le liquide 4, obtenu à partir du filtrat de la précipitation initiale, est encore actif.

Les témoins, préparés en traitant une solution d'acide phosphotungstique par de la baryte, en filtrant, et en ajoutant au milieu le filtrat, ne donnent pas de résultats.

Analyse des divers extraits.

	extrait non traité	liquide IV	liquide III
résidu sec	18.2 %	4.92 %	0.24 %
cendres	0.328 %	0.28 %	0.02 %
mat. org.	18.872 %	4.64 %	0.220 %

Cette précipitation a donc permis d'éliminer le 97 % des substances de l'extrait. Dans l'extrait non traité, les matières organiques constituent le 98.19 %, dans le liquide III, le 91.67 %. Dans nos expériences, nous commençons à observer une action du liquide III (à 0.16 % de résidu sec), à partir de ½ cc., ce qui revient à 0.000016 g. de substance sèche par cc. de milieu. Si nous nous rappelons qu'avec l'extrait non traité nous obtenions une action plus efficace avec 0.0000264 g., nous aurons la preuve que le facteur actif n'a été qu'incomplètement précipité et que dans le liquide III se trouvent encore d'autres substances. Les extraits de germes obtenus selon notre méthode ont une teinte jaune ocre plus ou moins foncée, selon leur concentration. Par adjonction d'une base (Ba $[OH]^2$, KOH, NaOH), la teinte vire au jaune citron, et revient au jaune ocre, mais plus clair, par addition d'un acide concentré.

La chaleur, l'alcool, l'acide chlorhydrique et acétique concentré de même que le ferro-cyanure de potassium acétique n'ont aucune action; par contre la réaction d'Esbach est positive. La réaction du biuret est négative, mais celle de Millon et de la ninhydrine sont fortement positives, de même que celle de Fehling. Notre liquide final contient donc encore des glucides réducteurs en quantité appréciable de même que des protides ou des produits de leur désintégration.

	extrait non traité	liquide IV	liquide III
Ninhydrine . . .	+++++	++	? presque nulle
Millon	++++	++	0
Esbach	+++	0	0
Fehling	++++	+	0
Phosphore [1] . . .	+++	+	0

[1] Calcination des cendres qui sont reprises par de l'eau acidulée; précipitation du phosphore à l'état de phosphomolybdate, en milieu nitrique.

Expérience 18.

Action vitaminique possible de quelques amines.

On sait que chez les animaux, certaines substances chimiquement définies et bien connues, peuvent, dans certains cas manifester une action de nature vitaminique et se substituer en partie à une vitamine; l'histamine en est un exemple : adjointe à un régime carencé en vitamine B, elle prévient chez le rat les troubles nerveux de l'avitaminose B sans pouvoir empêcher d'évolution cachectique des animaux. La tyramine produit chez le pigeon une amélioration temporaire (Lipschitz, Abderhalden); la méthylamine, la diéthylamine, l'oxyéthylamine, l'isoamylamine sont, selon Abderhalden, sans action. Le bétaïne ne produit pas d'amélioration chez le pigeon (Schaumann et Williams); l'hordénine est sans action (Lipschitz).

Parmi les substances qui n'ont pas d'action sur la levure et qui ne peuvent se substituer au facteur accessoire du développement nous avons : la choline (Abderhalden), la glucosamine (Swoboda), l'histidine (Swoboda, Abderhalden). Pour plus de détails voir : Randoin et Simonnet, « La question des vitamines », p. 243 et suivantes.

Pour *Phycomyces*, nous avons été amené à constater que l'hordénine n'est pas capable de se substituer au facteur du développement de ce champignon. Le fait suivant nous a orienté vers l'étude des amines : observant que certains échantillons de maltose du commerce, réputés purs, devaient contenir un facteur actif accélérant le développement de *Phycomyces*, et sachant que ces sucres sont obtenus par hydrolyse de la fécule de pomme de terre par le malt d'orge, nous nous sommes demandé si ce rôle singulier ne devait pas être attribué à l'hordénine qui, comme on le sait, se forme lors de la germination du grain d'orge.

Dans un travail récent, L. Ronsdorf (1931), étudiant les conditions de formation des zygotes chez *Phycomyces*, est amenée à constater que l'histamine, « probablement apparentée à la vitamine B », peut à dose très faible et jointe à une quantité suffisante de sucre,

permettre la formation des zygotes. Aucun chiffre n'est indiqué, si ce n'est que seules quelques zygotes arrivèrent à leur complet développement : « es trat eine dichte Reihe von Verknäuelungen auf, ausserdem Schlingen und einige fertig ausgebildete Zygoten. » La quantité utilisée était de 0.05 mg. pour un vase de Pétri de 25 cc., soit 0.000002 g. par cc. de milieu, quantité extrêmement faible !

Nous avons effectué quelques essais en ajoutant à des milieux pauvres et inactifs des petites doses de diverses amines. Celles-ci sont dissoutes dans de l'eau stérile et ajoutées avec une pipette stérile aux milieux sortant de l'autoclave. Elles ne subissent donc pas l'action de la chaleur.

a) Histamine.

Maltose pur crist. Merck 8 g. %.
Avec ou sans asparagine 0.8 g. ‰.

8e jour	témoin	0,000025	0,00005	0,0001	0,0002 g. par cc. de milieu
sans asparagine	105	85	—	96	94
avec »	50	—	50—70	70—75	55

Série sans asparagine : zygotes isolées, en file; mycelium aérien très tenu et clairsemé; aspect typique des milieux sans asparagine

Série avec asparagine : zygotes en ligne plus large; beaucoup de zygotes abortives (trop de N ?); mycelium plus développé que dans la série précédente.

b) Tyramine.

Même milieu de culture.

8e jour	témoin	0,000025	0,00005	0,0001	0,0002 g. par cc.
sans asparagine	120	130	105	118	113
avec »	165	20	130	35	70

En ce qui concerne le développement, mêmes remarques que pour *a*.

c) Ethylendiamine (hydrate).

Maltose pur crist. Schuchardt 8 g. %.
Asparagine 0.8 g. ‰.

	témoin	0,00025	0,0005	0,001	0,002 cc. par cc. de milieu
7e jour	50	10	3	0	0
pH. . .	5 env.	6—6.2	7.5	8 env.	8—8.5

Avec 0.001 g., pas de contact entre les deux myceliums qui sont très faiblement développés. Avec 0.002 g. pas de germination. Ailleurs un grand nombre de zygotes abortives.

d) Ethylamine.

Glucose puriss. Siegfried 10 g. %.

Asparagine 0.5 g. ‰; milieu valable pour *e*, *f* et *g*.

	témoin	0.0001	0 001	0.002 cc. par cc. de milieu
10e jour . .	0 et 4	9	105	0

Partout très faible mycelium aérien.

e) Choline (chlorhydrate).

	témoin	0.00002	0.0002	0.0004 g. par cc.
10e jour . . .	0 et 4	0	0	0

Mycelium aérien presque nul.

f) Glucosamine (chlorhydrate).

	témoin	0.00002	0.0002	0.0004 g. par cc.
11e jour . . .	0 et 4	8	2	10

Mycelium aérien nul.

g) Bétaïne (chlorure).

	témoin	0.00002	0 0002	0.0004 g. par cc.
10e jour . . .	0 et 4	5	0	0

Mycelium aérien nul.

Dans quelques essais nous avons ajouté au milieu de petites quantités d'hordénine, d'histidine (base hexonique), de choline, de bétaïne, séparément, puis ensemble; ces corps ont été stérilisés avec le milieu; aucun résultat positif.

Il semble donc bien que dans les conditions de nos expériences, les amines utilisées sont inaptes à se substituer au facteur actif auquel nous avons affaire. Nous ne pouvons donc, sur ce point seulement, confirmer les résultats de L. Ronsdorf. Leur interprétation nous est d'ailleurs difficile puisqu'aucun chiffre n'est indiqué. Si l'on songe « aux quelques zygotes qui se sont complètement formées », nous sommes loin des 1000 à 1300 copulations ayant donné des résultats sur nos milieux, alors que le témoin n'en fournit aucune !

Il est certain que certaines amines peuvent, en quantité suffisante servir d'aliment azoté. Un essai tenté, en substituant à l'asparagine

du sulfate d'hordénine en quantité isoazotée, nous a permis d'obtenir une culture parfaitement développée, avec une de nombreuses zygotes. Mais il s'agit dans ce cas d'une action alimentaire simple et il nous semble difficile de conférer à ce phénomène une nature vitaminique. Nous n'entendons pas par là nous prononcer sur la nature chimique de notre substance active et discuter si elle a ou non la structure d'une amine : ceci est un autre problème.

Nous ne pensons pas qu'un examen chimique plus approfondi soit actuellement indispensable. Il nous semble plus intéressant de suivre la voie biologique et de rechercher 1° quelles sont les matières dont les extraits sont susceptibles d'agir sur le développement et la sexualité du champignon, 2° avec quelles autres espèces de Mucorinées, hétérothalliques et homothalliques (et peut-être d'autres champignons!) ce phénomène d'accélération de croissance peut-il être observé. Les résultats obtenus en ce qui concerne ce dernier point sont déjà très encourageants.

Si nous comparons les résultats obtenus avec le maltose de Kahlbaum et les divers extraits de levures, avec ceux que nous a donnés le germe de blé, nous constatons une identité d'action. D'autre part les caractères généraux de thermolabilité, d'adsorption par le noir animal sont identiques; de même les limites inférieures d'action sont voisines pour les divers extraits. Il nous semble donc plausible d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une seule et même substance, se trouvant en plus ou moins grande abondance suivant les sources considérées.

Identification du facteur actif.

Le problème de la détermination des divers éléments constituants du groupe des vitamines B est actuellement l'un des plus difficiles de la vitaminologie. A part la vitamine B^1, dont une formule chimique qui semble définitive vient d'être donnée par Windaus et ses collaborateurs, aucun autre constituant du groupe n'a été chimiquement défini. Il faut comprendre dans ce complexe la vitamine antinévritique. B^1, la vitamine antipellagreuse B^2, et, si nous adoptons la classification de L. Randoin, le facteur d'utilisation nutritive et un facteur d'utilisation cellulaire que certains auteurs croient répandu; dans cette classification, la vitamine d'utilisation nutritive serait la B^2, celle d'utilisation cellulaire, la B^3, la vitamine antipellagreuse étant à part. Il faut y joindre encore le bios de Wildiers, ou facteur de croissance de microorganismes que certains considèrent comme appartenant à la vitamine de croissance cellulaire; cette dernière serait thermostable et dans certaines conditions alcalinostable; la vitamine d'utilisation nutritive serait thermostable mais détruite à chaud par les alcalis, et la vitamine B^1, thermolabile et détruite également par les alcalis. L. Randoin indique également que le caractère d'adsorption par la

terre à foulon peut aussi constituer un critère : forte pour la vitamine B^1, cette adsorption serait nulle pour la vitamine de croissance cellulaire.

En présence de ces faits nous ne pouvons que confirmer les conclusions temporaires auxquelles nous étions parvenu en procédant par élimination : la thermostabilité de notre facteur et sa résistance aux alcalis l'éloignent des vitamines B^1 et B^2 de Randoin, mais le rapprochent du facteur d'utilisation cellulaire (ou bios ?) sans que rien ne nous permette une identification définitive. En ce qui concerne le bios, Miller (1924) en distingue deux : le bios I, précipitable par la baryte, et le bios II, adsorbable par le noir animal, alors que le I ne l'est pas. Kerr (1928) en distingue deux également le α et le β bios. Les recherches relatives à l'identification chimique du bios n'ont pas jusqu'à maintenant donné de résultats définitifs. Goy (1921) isole du milieu de culture de Mucor mucedo (sur milieu de Meyer), une substance cristallisable et fusible vers 170°, qui, ajoutée à *Aspergillus niger* croissant sur milieu de Raulin, accélère son évolution. Cette substance résiste à 130°, pendant 1½ heure, ne contient ni azote ni phosphore et, selon l'auteur, se rapprocherait des vitamines sans pouvoir y être assimilée. Ces recherches n'ont pas été répétées. De même, on a contesté l'activité du produit isolé par Eddy, Kerr et Williams ($C^5H^{11}NO^3$, pt. de fusion : 223°), (1924). 61 substances diverses ont été essayées par divers expérimentateurs en ce qui concerne leur activité sur le développement de la levure cultivée en milieu artificiel; aucune ne peut se substituer au bios (cf. Randoin et Simonnet, « La question des vitamines », 1927, p. 234).

En présence de ces faits, nous constaterons que, tant qu'une identification chimique ne peut être faite, aucune assimilation certaine de notre facteur avec l'un ou l'autre des facteurs déjà connu ou supposé ne peut être effectuée. Nous considérerons donc notre substance comme un facteur du développement des Mucorinées (croissance et sexualité), quitte, si les preuves chimiques peuvent en être apportées, à le confondre avec un facteur déjà connu, bios ou autre. Remarquons simplement que dans l'état de nos connaissances c'est du facteur de croissance cellulaire (bios) qu'il se rapproche le plus.

L'action d'un biocatalyseur de fermentation, cozymase, facteur Z (présent dans le germe de blé) ne peut être invoquée ici. La conclusion pratique que l'on peut tirer de ces recherches est que pour des travaux quantitatifs, la pureté des produits employés à la constitution du milieu doit être soigneusement examinée. En introduisant, ne fut-ce qu'une trace d'une substance active jointe à un sucre, on fait intervenir une inconnue qui fausse totalement les résultats des expériences; ceci peut n'avoir qu'une importance minime pour certaines recherches dans lesquelles un milieu naturel convient parfaitement, mais au con-

traire une importance capitale lorsqu'on recherche l'influence de l'un des constituants du milieu. Dans le cas de la présence d'une impureté, on ne sait exactement à l'influence de quel constituant rapporter les variations observées.

Pour une étude quantitative, nous proposons pour *Phycomyces*, ainsi que pour les autres Mucorinées sensibles à l'action de substances actives, le milieu suivant :

Maltose très pur (par exemple celui chim. pur crist. de Schuchardt) ou tout autre échantillon plusieurs fois recristallisé	8 à 10 g. %
Asparagine	0.5 g. ‰
$MgSO^4$	0.5 g. ‰
KH^2PO^4	2 g. ‰
Extrait concentré de levures (par exemple l'extrait Harris) ou un extrait préparé dans les conditions indiquées, ou un extrait de germe de blé	0.005—0.01 g. %

En procédant de la sorte, on peut rapporter à chaque constituant la part d'action qui lui est due. Si l'on étudie l'influence d'un constituant minéral, ou d'un glucide, on saura que c'est en présence d'une quantité donnée d'un facteur actif, que l'on peut assez exactement doser si l'on part d'extraits qui sont toujours préparés d'une manière identique, à partir des mêmes matières.

Conclusions.

Le germe de blé est étudié au point de vue de son action sur la croissance et la sexualité de *Phycomyces*.

Ses extraits aqueux se montrent actifs et, à faible dose, ils accélèrent considérablement la croissance et les manifestations des affinités sexuelles.

Les cendres de germes n'ayant pas d'effet, un élément minéral agissant comme infiniment petit chimique ne semble pas devoir intervenir.

Nous pensons qu'il s'agit d'une substance active, de nature vitaminique, analogue à celle qui doit se trouver jointe à certains échantillons de maltose pur, et qui se trouve en abondance dans certaines levures et leurs extraits. Elle se trouve également dans la polissure de riz.

Cette substance est très thermostable et résiste, dans les conditions de nos expériences, à l'action des alcalis. Elle n'est pas détruite par les rayons ultra-violets; elle est adsorbée totalement par le noir animal, mais pas par la terre à foulon. Elle n'est qu'incomplètement précipitée par l'acide phosphotungstique. Elle agit surtout, dans les conditions de nos expériences, avec le maltose comme source de glucide, de même qu'avec le glucose et le saccharose.

Elle semble permettre au champignon de résister à des conditions défavorables telle que par exemple au ralentissement de développement produit par une dose trop élevée d'asparagine.

Son mode d'action et ses caractères généraux la rapprochent du facteur d'utilisation cellulaire (bios) mais sans que nous puissions dire s'il y a réellement identité. Nous la considérons comme un facteur du développement des Mucorinées (développement végétatif et sexualité). La numération des zygotes permet de se rendre facilement compte de l'intensité de son action. Jusqu'à un certain point l'action croit avec la quantité de substance (extrait) ajoutée, mais à partir de ce point, une augmentation de la dose est sans effet. Son action a été étudiée avec le milieu de Coons modifié, sur des milieux agarisés.

Ce facteur ne peut être remplacée par certaines amines telle que l'hordénine, l'histamine, la choline, la bétaïne, la glucosamine, la tyramine, l'éthylamine, l'éthylènediamine, ni par une base hexonique telle que l'histidine.

L'intervention d'un facteur liposoluble, adjoint à certains lipoïdes du commerce tels que la lécithine a été examinée : elle ne peut être mise en évidence dans nos expériences (nos extraits sont privés de lipides). Nous nous réservons encore sur ce point.

Travaux cités.

Eddy (W. H.), Kerr (R. W.), and Williams (R. R.) : The Isolation of a Cristalline Substance (M. P. 223° C.) having the Properties of Bios. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1924, T. 21, p. 307.

Voir aussi : Journ. Amer. Chem. Soc., 1923, T. 46, p. 2846.

Goy (P.) : Les facteurs accessoires de la croissance chez les végétaux inférieurs. Thèse Science, Paris, 1921.

Funk (C.) : Die Vitamine. München, Bergmann, 1924.

Ide (M.) : Signification du Bios. Rev. belge des Sci. Med., 1931, T. 3, p. 406.

Miller (W. L.) : Wildier's Bios. Science, 1924, T. 59, p. 197.

Nitsescu (J. J.) : L'action de la chaleur (autoclave) et de la chaleur sèche (étuve) sur le Facteur B. Compt. Rend. Soc. de Biol., 1923, T. 89, p. 1244.

Randoin (L.) et Simonnet (H.) : Les données et inconnues du problème alimentaire. II. La question des Vitamines. Paris, Les presses universitaires de France, 1927.

Randoin (L.) et Lecoq (R.) : Les vitamines solubles du groupe B. Essai de mise au point de la question jusqu'à ce jour. Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, T. 11, p. 745.

Ronsdorf (L.) : Ueber die chemischen Bedingungen von Wachstum und Zygotenbildung bei *Phycomyces blakesleeanus*. Planta, 1931, Bd. 14, p. 482.

Schopfer (W. H.) : Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces blakesleeanus*. Influence des substances vitaminiques. Bull. Soc. Bot. Suisse, 1931, T. 40, p. 87, et T. 41, p. 73.

idem. : Sur le facteur accessoire de croissance contenu dans le germe de blé; son action sur la sexualité de *Phycomyces*. Compt. Rend. Soc. Phys. Hist. nat., 1932, T. 49, p. 70.

idem. : Sur l'action vitaminique supposée de quelques amines. Compt. Rend. Soc. Phys. Hist. nat., 1932. T. 49, p. 146.