

Recherches sur un facteur de croissance de microorganisme : son action sur les Mucorinées : essai de généralisation

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

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **43 (1934)**

Heft 2

PDF erstellt am: **08.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-29098>

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 sur un facteur de croissance
de microorganisme. Son action sur les Mucorinées.
Essai de généralisation.**

Par *W.-H. Schopfer*.

Institut botanique de l'Université de Berne.

Manuscrit reçu le 28 avril 1934.

La Mucorinée *Phycomyces blakesleeanus* s'est montrée, dans des conditions déterminées, très sensible à l'action d'un facteur de croissance contenu dans la levure, dans le germe de blé, dans les extraits concentrés de levures (solubles dans l'eau). Sur un milieu à base de glucose puriss. 10 ‰, asparagine puriss. 1 ‰, $MgSO_4$ 0,5 ‰, KH_2PO_4 1,5 ‰, on n'observe qu'une faible germination de spores, les hyphes ne se développent pas, il n'apparaît aucun mycélium aérien; avec adjonction de quelques γ de ces extraits, il se produit un mycélium abondant et de nombreux sporanges. De même, la formation des zygotes est fortement accélérée. Le développement végétatif passe de quelques mgr. pour le témoin à 50—100 mgr. pour l'expérience avec adjonction de substance active, les zygotes de 0 à 1000.

A. Influence sur la sexualité.

Nous nous demandons ici si ces phénomènes sont liés à quelques couples de souches ou s'ils peuvent s'observer avec toutes les souches de *Phycomyces* dont nous disposons. Ces souches font partie de 5 générations issues de la même zygote et fournies par le professeur Burgeff; en plus, nous avons un couple de souches provenant de l'Institut de Physiologie végétale de Berlin (I. P.) et un de Washington (D^r Blakeslee) (Ba). Le milieu est le même que celui cité plus haut. A 500 cc. de milieu nous ajoutons 4 cc. d'extrait de germes de blé pur, préparé selon la technique habituelle et renfermant 14 ‰ de résidu sec; il y aurait donc par cc. de milieu 0,0012 g. de substance sèche. Cette dose est de beaucoup supérieure à la dose limite active. Cette limite ayant déjà été établie, nous avons choisi une quantité plus forte, afin d'être assuré d'une possibilité d'action indiscutable. Le tout est stérilisé à 120° pendant 20 minutes, le facteur de croissance étant thermostable. Le milieu solide contient 3 ‰ d'agar, les ensemencements se font à raison de 3 gouttes de suspension de spores pour les sexes (+) et (—). Température de culture 18°. Pour chaque couple utilisé, nous avons un témoin sans facteur de croissance.

Les observations se font après 7 jours de culture.¹

	IP (+) × IP (-)	Ba (+) × Ba (-)	52 (+) × 129 (-) IV V
Témoin + fact. de croissance	0 large ligne de zygotes jaunes en formation	0 id.	0 450
	3 (+) × 51 (-) III IV	10 (+) × 4 (-) III III	8 (+) × 160 (-) III V
Témoin + fact. de croissance	0 450	0 100	0 large ligne jaune, beaucoup de zygotes avortées

Nulle part les témoins ne présentent de mycélium aérien; par contre, avec adjonction de facteur de croissance, mycélium aérien très dense, avec de nombreux sporanges bien formés.

Les expériences suivantes sont faites avec 3 cc. du même extrait de germe de blé pour 5000 cc. du même milieu.

	46(+) IV	× 15(-) III	12(+) III	× 48(-) IV	54(+) IV	× 2(-) I	53(+) IV	× 26(-) IV	7(+) III	× 17(-) IV
Témoin + fact. de croissance	0 260		0 130		0		1 400 450		0 300	
	ligne de 4 mm.		ligne de 5 mm.		ligne de 4 mm.		ligne de 3 mm.		ligne de 4 mm.	

Chez le témoin, très faible mycélium aérien de surface, pas de hyphes aériennes, pas de ligne de réaction sexuelle. Pour les expériences avec facteur de croissance, mycélium aérien dense et luxuriant, cachant complètement la ligne de zygotes.

Il apparaît donc, à l'aide de ces croisements faits au hasard et comportant 22 souches différentes, que toutes ces dernières réagissent à la présence du facteur stimulant contenu dans le germe de blé. Les réactions sont différentes, les potentialités des diverses souches l'étant également.

Sur un milieu *naturel* (malt-agar) favorable au développement végétatif et à la sexualité, les résultats sont différents aussi, quoique le milieu soit semblable (cf. Wesendonck). Il n'est du reste pas certain que chaque souche de cette même espèce ait exactement les mêmes conditions de culture.

¹ Les chiffres romains placés sous le numéro d'ordre de la souche se rapportent à la génération (de I à V).

Il s'agit maintenant de savoir si d'autres Mucorinées voisines réagissent également à la présence de ces facteurs.

Les espèces utilisées sont :

Phycomyces blakesleeanus, comme témoin (±)

Absidia coerulea (Berlin) (±)

Absidia glauca (Washington) (±)

Absidia orchidis (Washington) (±)

Absidia repens (Baarn) (±)

Mucor hiemalis (Berlin) (±)

Mucor hiemalis (Washington) (—)

Mucor mucedo (Washington) (±)

Rhizopus nigricans (Baarn) (a et b)

Le milieu et les conditions de culture sont les mêmes que pour les expériences précédentes.

Résultats obtenus

	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Mucor mucedo</i>	<i>Absidia orchidis</i>	<i>Mucor hiemalis</i>
Témoin . .	<i>pas de contact</i> entre les 2 sexes	<i>pas de contact</i>	<i>pas de contact</i>	<i>pas de contact</i>
(2 ^{me} jour) .	myc. aérien faible	pas de myc. aé- rien	myc. aérien très faible	myc. aérien faible
+ facteur de crois.	<i>contact, myc.</i> aérien dense et élevé	<i>contact, myc. aé-</i> rien faible	<i>contact, myc.</i> aérien plus dense	<i>contact, myc. aé-</i> rien touffu et plus élevé
Témoin . .	ligne de zygo- tes aériens. Faible, non visible par transparence	zygote : 0	faible ligne de zygotes	zygote : 0
(5 ^{me} jour) .	large ligne de zygotes bien visible par transparence	beaucoup de copulations, pas de zygo- te visible	large ligne de zygotes vi- sible par transparence	zygote : 0 mais fort myc. aérien
+ facteur de crois.				

	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>
Témoin	très faible mycélium aérien	culture très faible, presque pas de mycélium aérien
(2 ^{me} jour) + facteur de crois- sance	développement extrême- ment intense	contact partiel
Témoin		<i>aucun contact, culture</i> faible
(5 ^{me} jour) + facteur de crois- sance	comme pour le 2 ^{me} jour	développement intense 500—550 zygotes

	<i>Mucor mucedo</i>	<i>Absidia glauca</i>	<i>Absidia repens</i>
Témoin (5 ^{me} jour) + facteur de croissance	zygotes: 0 100 zygotes	large ligne de zygotes large ligne de zygotes, développement végé- tatif plus intense	zygotes: 0 zygotes: 0 développement vé- gétatif plus intense

Il apparaît donc que *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucour mucedo*, *Absidiea coerulea* et *orchidis* sont dans les conditions de nos cultures, sensibles, mais d'une manière inconstante, à l'action d'un facteur de croissance du germe de blé, tant en ce qui concerne le développement végétatif que la sexualité. La différence d'avec le témoin est très nette au début, elle tend à s'atténuer ensuite. *Phycomyces blakesleeanus* occupe une place tout à fait spéciale; les différences se manifestent avec une intensité et une constance que l'on ne retrouve chez aucune des autres Mucorinées étudiées.

Dans un second essai avec les mêmes souches, nous pratiquons la numération des zygotes. Pour *Phycomyces*, cela peut se faire à l'œil nu. Pour les autres espèces, nous effectuons un certain nombre de numérations avec l'objectif 3 du microscope. En additionnant tous les résultats obtenus, nous avons des chiffres qui sont comparables entre eux et donnent une idée de la densité de la ligne de zygotes.

Témoin				
	sans facteur de croissance		avec facteur de croissance	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>				
total	0		600—700	
<i>Mucor mucedo</i>				
total	0		100	
<i>Absidia orchidis</i>	9, 10, 11, 11, 9, 9, 3, 4, 12, 17, 18, 17		25, 13, 21, 19, 14, 25, 15, 22, 14	
total	130		total	168
<i>Absidia repens</i>				
total	0		0	
<i>Mucor hiemalis</i>				
total	0		0	
<i>Absidia coerulea</i>	larges lignes de zygotes, égales en densité			
<i>Absidia glauca</i>	idem.			

En ce qui concerne la sexualité, il est donc indiscutable, que certaines Mucorinées sont sensibles et d'autres pas; chez toutes il y a accélération du développement végétatif visible au début.

Les variations de milieu peuvent-elles avoir une influence sur l'action du facteur de croissance ?

Nous savons que les variations des constituants azoté et carboné ont une grande influence sur la sexualité; il existe même pour *Phycomyces* des conditions telles que le développement se fait sans facteur de croissance (Schopfer 1932). Pour *Absidia orchidis*, nous faisons varier l'asparagine.

Asparagine	Dans les champs mesurés	
	avec facteur 0,1 cc. pour 50 cc. de milieu	Témoin
1 ‰	245	231
2 ‰	104	122
3 ‰	88	80
4 ‰	30	27
5 ‰	rares zygotes isolées	

Dans aucun cas nous n'avons une différence nette en faveur de l'expérience avec facteur de croissance.

Dans les 5 expériences, le développement végétatif est un peu accéléré au début (avec facteur), mais il y a ensuite une sorte de compensation. Avec 4 et 5 ‰ d'asparagine, la coloration violette du champignon est un peu plus faible. Avec toutes les doses d'asparagine le développement végétatif est très intense malgré la forte dose d'azote qui chez *Phycomyces* et *Mucor hiemalis* agit en inhibant le développement. Les spécificités culturales sont fortes parmi les Mucorinées.

B. Influence sur le développement végétatif en milieu liquide.

a) Action de l'extrait de germe de blé sur diverses Mucorinées.

Même milieu que précédemment. Extrait de germes à 17,7 ‰ de résidu sec, dilué 10 fois; 20 cc. de milieu. Ensemencé avec une suspension dense de spores. E = émersion.

Absidia repens (—) Baarn

	Témoin	$\frac{1}{10}$	$\frac{5}{10}$	1	2	4 cc.
5 ^{me} jour	pas E.		émersion croissante			
7 ^{me} jour	pas E.	$\frac{1}{2}$ cm.	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	1 cm.	1 cm. haut.
8 ^{me} jour	34	37	49	51	58	65 mgr. de substance sèche

Avec $\frac{1}{10}$ de cc. il y a augmentation de poids de la récolte sèche et augmentation de la hauteur du mycélium aérien.

Absidia coerulea (+) Baarn

	Témoin	$\frac{1}{10}$	$\frac{5}{10}$	1	2	4 cc.
5 ^{me} jour	pas E.			émersion croissante		
7 ^{me} jour	pas E.	1 cm.	1—1½ cm.	1½ cm.	1½ cm.	1½—2 cm.
			(teinte violette de plus en plus intense)			
8 ^{me} jour	50 mgr.	65 mgr.	69 mgr.	63 mgr.	76 mgr.	90 mgr. de substance sèche

Avec $\frac{5}{10}$ cc. il y a augmentation de l'intensité de la teinte violette, de la hauteur du mycélium et du poids de matière sèche.

Mucor mucedo (—) Berlin

5 ^{me} jour	pas E.			émersion croissante		
7 ^{me} jour	E. très faible	E. nette		sporanges idem.		
		sporanges		peu de mycélium, mais		
8 ^{me} jour	28 mgr.	44 mgr.	33 mgr.	29 mgr.	34 mgr.	52 mgr. de substance sèche
			sporanges de plus en plus nombreux			

Avec $\frac{1}{10}$ et $\frac{5}{10}$ influence nette.

Mucor hiemalis (+) Berlin

	Témoin	$\frac{1}{10}$	$\frac{5}{10}$	1	2	4 cc.
5 ^{me} jour	pas E.			fort mycélium submergé, jaune intense		
7 ^{me} jour	faiblement jaune			peu de différence dans le développement		
8 ^{me} jour	29 mgr.	32,5 mgr.	29 mgr.	34 mgr.	33 mgr.	40 mgr. sec.

Peu de différence

Mucor hiemalis (—) Washington

5 ^{me} jour	pas E.			mycélium immergé croissant peu de myc. aérien		
8 ^{me} jour	19 mgr.	32 mgr.	50 mgr.	52 mgr.	62 mgr.	75 mgr. sec.
		Différence nette avec $\frac{1}{10}$ cc				

Absidia orchidis (+) Washington

5 ^{me} jour	faibl. E.	E. nette	violet	E. et teinte violette croissante		
		violet	jaune			
7 ^{me} jour	1 cm.	$\frac{1}{2}$ cm.	1½ cm.	1½—2 cm.	1½—2 cm.	2 cm. haut.
8 ^{me} jour	45,5 mgr.	63 mgr.	59 mgr.	64 mgr.	72 mgr.	90 mgr. sec.

Avec $\frac{1}{10}$ de cc. déjà, différence nette

Absidia glauca (+) Washington

5 ^{me} jour	E. faible blanc	E. forte vert	Emersion et teinte verte de plus en plus forte			
7 ^{me} jour	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{3}{4}$	1 cm.
8 ^{me} jour	95	85	90	85	92	— mgr. sec.

Aucune différence

Thamnidium elegans (Berne)
(homothallique)

Développement faible, très peu de différence entre les divers termes de l'expérience.

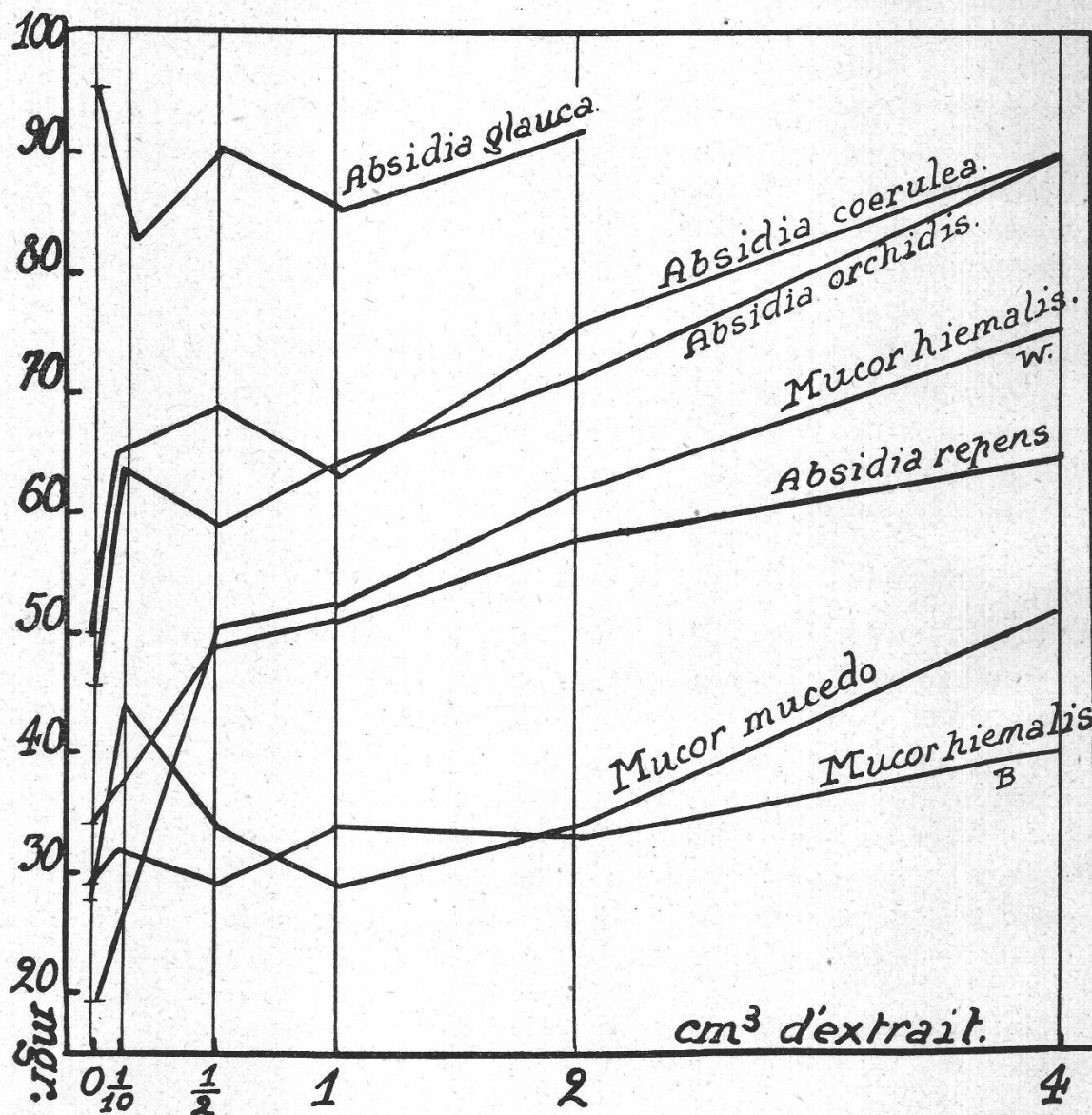


Fig. 1.

Action de l'extrait de germe de blé sur diverses Mucorinées.

On voit donc qu'un certain nombre d'espèces sont sensibles tant au point de vue du poids de matière sèche que de la hauteur du mycélium aérien, de la formation du pigment, de la présence du sporangio-phores aériens et de sporanges bien développés. En aucun cas on ne trouve ces manifestations étonnantes qui caractérisent *Phycomyces* chez lequel la différence entre l'expérience avec facteur de croissance et le témoin va du tout au rien.

Nous devons cependant faire cette réserve que pour notre étude, il faut un milieu de départ tel qu'il soit déficient; avec d'autres milieux peut-être, la différence serait plus marquée. Nous croyons pour l'instant, qu'il est inutile d'appliquer à d'autres espèces la technique qui réussit si bien avec *Phycomyces* et pour laquelle ce champignon est un réactif si sensible.

S'agit-il pour *Phycomyces* d'une action directe sur la sexualité ou celle-ci ne s'exerce-t-elle que par l'intermédiaire du développement végétatif qui est tout d'abord influencé? Les faits observés jusqu'à maintenant semblent venir à l'appui de la première hypothèse. On sait combien les phénomènes de la sexualité et ceux du développement végétatif sont liés chez ces champignons. Tout ce qui agit sur la seconde, retentit également sur la première.

Cependant nous avons montré que dans certaines conditions (action de la gélatine par exemple) le développement végétatif est extrêmement intensifié, alors que la formation des zygotes est complètement inhibée. Il y a donc conditionnement spécifique de la végétation et de la sexualité. Dans le cas de la gélatine c'est la notion du rapport

carbone
azote qui doit intervenir; lorsque la quantité d'azote est trop élevée, les manifestations des affinités sexuelles sont diminuées bien que topographiquement elles pourraient se produire (hyphes bien développées, contact possible).

Il ne nous a pas encore été possible de trouver des conditions telles que le développement végétatif soit très ralenti et la formation des zygotes normale. Sur milieu solide, la chose est pratiquement impossible, car si les hyphes sont peu développées il n'y a pas de contact, partant pas de zygotes. Il faudrait trouver une technique permettant l'emploi de milieux liquides pour l'étude de la formation des zygotes.

Jusqu'à maintenant, nous avons surtout effectué avec *Phycomyces* des cultures en milieu solide dans le but d'étudier la formation des zygotes. Il est indispensable d'effectuer également des cultures en milieu liquide afin d'étudier les modalités de l'action de nos extraits sur le développement végétatif seul, en l'absence de toute sexualité et de fixer les limites inférieures d'action.

b) Action d'extrait de germes de blé sur *Phycomyces*.

Extrait aqueux total, autoclave pendant 15 minutes à 130°; les germes ont été au préalable dégraissés par l'éther. Résidu sec : 17,73 g. ‰.

Milieu habituel avec 10 ‰ glucose puriss. et 1 g. ‰ d'asparagine. Souche 17 (—) Bgf.

30 cc. de milieu stérilisé avec l'extrait							
	Témoin	$\frac{5}{100}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{3}{10}$	$\frac{4}{10}$	$\frac{5}{10}$ cc.
6 ^{me} jour	rien	5	5	5	5—6	5—6	5—6 cm.
7 ^{me} jour	rare boyaux de germinat.				peu de différences partout hauteur et densité égales		8—10 cm.
14 ^{me} jour	0	94,5	95	105	121	123,5	133 mgr. de substance sèche

L'action est extrêmement forte, déjà avec $\frac{5}{100}$ de cc. ce qui correspond à 0,00029 g. de résidu sec par cc. de milieu.

Avec un autre extrait de germes de blé, exposé aux rayons ultra-violetts (totaux) nous avons les résultats suivants (une partie a été au préalable dégraissée par l'éther, avant l'irradiation, l'autre non). Souche 17 (—) Bgf.

Dégraissé

	Témoin	$\frac{1}{10}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{5}{10}$	1 cc.
1 ^{er} jour	rien	boyaux de germination visibles			
6 ^{me} jour	rare boyaux	5	5	5	5 cm. haut.
7 ^{me} jour	id.	partout 8—10 cm.			
15 ^{me} jour	id.	89	102	121	116,5 mgr. de substance sèche

Non dégraissé

6 ^{me} jour	id.	$1\frac{1}{2}$	quelques mill.	$2\frac{1}{2}$	gazon ras myc. submer. bien dév.
7 ^{me} jour	id.	3	1	4	id.
8 ^{me} jour		38	28	65	72 mgr. de substance sèche

On ne peut concevoir une action plus nette. Il se manifeste une forte différence selon que les germes ont été dégraissés ou non. C'est la première fois au cours de nos expériences que nous voyons se manifester une action des lipides; il est vrai qu'ici ils sont irradiés par les U-V. totaux.

c) Action de l'extrait concentré de levures Harris sur Phycomyces.

L'extrait Harris est une préparation concentrée de levures entièrement soluble (ce qui indique son haut degré de concentration et de

purification). Elle se présente sous forme d'une poudre jaune très hygroscopique. Elle est étalonnée par Osborne et Wakemann. Au sens des physiologistes des animaux, elle est riche en vitamine B², pauvre en B¹. Pour nous, elle renferme un facteur de croissance de micro-organisme; elle accélère la marche de la fermentation. Elle nous a donné d'excellents résultats en ce qui concerne le développement de la sexualité de *Phycomyces*.

Même milieu que précédemment (30 cm³). La solution d'extrait (0,05 %) est ajoutée en quantité variable et stérilisée avec le milieu.

En ajoutant la solution à 30 cc. de milieu de culture, nous avons par cc. de milieu :

pour 1/10 cc. de solution d'extrait à 0,05 %	1,7 γ	par cc. de milieu				
» 1 » » » » » 0,05 %	17 γ	» » » »				
» 2 » » » » » 0,05 %	34 γ	» » » »				
» 5 » » » » » 0,05 %	85 γ	» » » »				
» 10 » » » » » 0,05 %	170 γ	» » » »				

Résultats obtenus

avec asparagine = 1/2 %

	Témoin	1/10	1	2	5	10 cc.
5 ^{me} jour	rien	net dév. subm.	Emersion et nombre de sporanges			croissants
6 ^{me} jour	id.	id.	2	2—3	4	3-4 cm. haut.
7 ^{me} jour	id.	id.	3—4	4	5—6	4-5 cm. haut.
8 ^{me} jour	0	5,2	29	29,8	33	31,2 mgr. substance sèche

avec asparagine = 1 ‰

	Témoin	1/10	1	2	5	10 cc.
5 ^{me} jour	0	net développ. submergé	Emersion et nombre des sporanges			croissants
7 ^{me} jour	qqes. ger- minations	id.	3	5—6	5	5-6 cm. haut.
8 ^{me} jour	0	3,8	39	63,6	76	77 mgr. substance sèche

Avec les deux concentrations d'asparagine, l'action stimulante se manifeste déjà avec 1,7 γ par cc. de milieu; avec 17 γ elle est très forte. Elle apparaît en relation avec la dose d'asparagine. En passant de 0,5 à 1 ‰, la récolte sèche est double. Comme, très certainement, le fac-

teur qui agit sur *Phycomyces* ne constitue qu'une petite fraction de l'extrait, on peut concevoir l'extrême activité de cette substance.

La question est donc résolue : ce facteur de croissance peut agir sur le développement végétatif seul; il agit par contre-coup sur la sexualité. Une réserve peut cependant être faite. Tant que nous n'avons pas une substance cristallisée définie, nous ne pouvons savoir si le facteur actif est unique. Il n'est pas irrationnel de supposer que nous puissions avoir deux substances dont l'une agirait sur le développement végétatif, l'autre sur la sexualité.

Lorsqu'on arrive à des doses aussi faibles, on touche à un problème important : celui de l'action catalytique des ions métalliques. Ceux-ci se retrouvent partout et l'on connaît leur action sur les microorganismes. D'après Bertrand, *Aspergillus niger* est sensible au manganèse à des quantités de l'ordre du milliardième et du décimilliardième. Le bacille tuberculeux est sensible au fer à des quantités de l'ordre du millionième. On connaît l'action du zinc sur *Aspergillus*. Nous avons montré celle du cuivre sur *Mucor hiemalis*.

Celle de divers autres métaux a été signalée. Ne se pourrait-il pas que le facteur de croissance soit simplement un ion métallique ? L'eau distillée ordinaire de laboratoire n'est jamais pure, l'eau bi-distillée encore moins. Une eau distillée ordinaire nous donne une réaction au cuivre positive (à l'acide rubéique, réaction à la touche). D'après Lasseur et Girardet, une eau de conductibilité $K = 1,4 \times 10^{-6}$, autoclavée pendant 20 min. à 120° dans un Erlenmayer en verre de Bohême acquiert une conductibilité électrique de 16×10^{-6} . Il est donc urgent d'examiner notre problème à ce point de vue.

Une impureté métallique pourrait s'introduire dans nos recherches

- 1° lors de la préparation du milieu de culture,
- 2° lors de la préparation des extraits et de leur adjonction au milieu,
- 3° lors de l'ensemencement (contenue dans les spores).

1. Lors de la préparation des milieux de culture.

A part le facteur, tous les milieux — y compris les témoins — sont préparés dans de la verrerie homogène (les récipients étant du même âge). L'eau distillée est la même que celle qui sert pour les extraits. On ne peut concevoir une action du cuivre contenue dans l'eau distillée ayant servi à préparer l'extrait lorsque celui-ci est ajouté à dose faible à 50 cc. de milieu préparé avec *la même eau*.

Une impureté minérale peut être jointe au $KH^2 PO^4$ et au $MgSO^4$; elle se retrouve aussi dans le témoin. Le thallium qui d'après Richards se retrouve dans certains échantillons d'asperagine n'exerce aucune action (Schopfer 1932). D'ailleurs il se retrouverait dans le témoin.

2. Lors de la préparation des extraits.

Les germes de blé (ou les levures) sont en contact avec de l'eau distillée, de l'alcool, de l'éther. Ils séjournent dans des flacons bleus et bruns. L'alcool, lors de sa préparation, est en contact avec du cuivre et du fer. Il pourrait donc contenir ces ions. Mais de l'alcool et de l'éther ajoutés au milieu témoin et évaporés, n'exercent aucune action stimulante. Cette hypothèse est donc exclue, aussi bien que l'a été celle de l'eau distillée.

Les flacons bleus et bruns qui servent à conserver les extraits sont soigneusement lavées, puis remplis avec de l'eau distillée ordinaire et soumis à l'autoclave (120° pendant ½ heure). Cette eau ajoutée au milieu témoin n'a pas d'action stimulante. Lors de la stérilisation des milieux les conditions sont les mêmes pour tous les milieux.

Il reste la possibilité d'un apport de ions par le germe de blé. Pour résoudre cette question, l'expérimentation directe est nécessaire.

Diverses expériences sont effectuées avec des sels minéraux : chlorure de lithium, chlorure de sodium, chlorure de caesium, chlorure de calcium, chlorure de baryum, hydrate de baryum, chlorure de nickel, de cobalt, d'aluminium, de manganèse, de fer, de zinc, nitrate d'argent, sulfate de mercure, acetate de plomb, sulfate de cuivre, chlorure d'or.

Les solutions sont préparées dans de l'eau distillée stérile, puis ajoutées au milieu stérilisé.

A 40 cc. de milieux de Coons sont ajoutées (1 cc. = 20 γ) :

$\frac{5}{100}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{2}$	1 cc.
1 0,025	2 0,05	10 0.25	20 γ pr. 40 cc. 0,5 γ pr. 1 cc. de milieu

Ces doses sont inférieures à celle de l'extrait de levures Harris p. ex.; cela doit être ainsi car s'il se trouve des ions métalliques dans les préparations, c'est à des doses infimes comme impuretés secondaires. K. et Mg. se trouvant déjà dans le milieu, n'interviennent pas.

Nulle part nous ne trouvons une action stimulante quelconque. Les cultures ne diffèrent pas du témoin. Dans un cas avec CuSO_4 un développement submergé un peu plus intense se manifeste (7 mgr. au lieu de 1—3 mgr.); mais le mycélium reste au fond du vase et il ne développe aucune hyphe aérienne.

Le fait que des métaux à action stimulante connue n'agissent pas (Fe, Zn, Cu) est extrêmement important.¹

Il reste à examiner d'autres métaux; leur action est peu probable.

¹ Selon Javillier (1914), Steinberg (1918), certains verres contiennent du zinc, qui peut agir sur *Aspergillus*. Pour *Phycomyces*, le zinc ne semble pas jouer de rôle. D'ailleurs le même verre est utilisé pour le témoin.

D'ailleurs, nos expériences ne se présentent pas comme les essais habituels avec métaux à action catalytique. Dans ce dernier cas, c'est à une culture qui se développe déjà que l'on adjoint un ion minéral conditionnant un développement encore plus intense. Dans notre cas, *c'est une différence du tout au rien; le facteur de croissance déclanche un développement intense à partir d'un milieu qui sans lui ne donne aucun résultat* (de 1—2 mgr. à 60—160 mgr., de quelques hyphes submergées à un développement aérien luxuriant).

L'hypothèse d'une impureté jointe lors de la préparation des extraits est peu probable.

Les extraits sont en contact avec le papier filtre (filtre Schleicher et Schüll); une impureté minérale pourrait s'introduire à ce moment dans nos extraits; mais elle devrait se retrouver dans les cendres de ceux-ci; or ces dernières n'ont pas d'action nette.

3. Lors de l'inoculation de nos milieux.

Pour diverses raisons nous introduisons une grande quantité de spores : de 30 à 80,000,000 par flacon (150 à 300 par $\frac{1}{10}$ mm³ de la suspension à inoculer). Mais la quantité est la même pour le milieu témoin; action directe exclue.

Pour toutes ces raisons l'action directe primitive d'un ion métallique ou de tout autre substance apportée par les spores n'entre pas en considération dans nos recherches. Il n'est pas exclu — ces ions se trouvant partout — qu'ils interviennent comme facteur secondaire dont la présence rendrait possible l'action du facteur de croissance de nature organique, à activité primaire. Cette hypothèse — qui est très plausible — sera examinée dans un autre mémoire.

Hypothèse de l'action d'une substance organique connue agissant à petite dose.

Nous avons déjà examiné l'action des divers amines (Schopfer 1933). Celle des acides aminés n'entre pas, d'après nos essais en ligne de compte.

Le glutation (seul ou avec fer), la cystine, la cystéine n'ont aucune action.

Ce facteur est-il analogue à une substance accélérant la fermentation ?

Nous partons d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* type (Baarn). Les cultures sont faites sur un milieu de Coons (semblable à celui déjà cité). Culture dans 40 cc. de milieu contenant : soit 1 cc. d'extrait de germe de blé, d'extrait de levure, soit 1 mgr. d'extrait concentré Harris, stérilisé avec le milieu de culture.

Inoculation avec 4,000,000 de cellules.

	Témoin	+ germe	+ extrait de levure	+ extrait Harris
glucose utilisé . . .	0,3%	7,05%	6,3%	1,55%
alcool produit % vol. .	?	2,8	2	0,2
matière sèche . . .	—	0,120 gr.	0,550 gr.	0,012 gr.

Tous nos extraits accélèrent la fermentation et la croissance de la levure. Comme il s'agit d'extraits non purifiés contenant certainement divers facteurs, on ne peut en aucun cas conclure à une identité. Au contraire, nous remarquons que le produit qui accélère le moins la fermentation (extrait Harris) est celui qui agit le plus fortement et à plus faible dose sur la croissance de *Phycomyces*. L'identité ne nous paraît pas possible.

Il nous reste donc l'impureté active, de nature organique, inconnue, que nous avons appelé facteur de développement de Mucorinée (facteur M) que l'on peut comme hypothèse de travail, rapprocher des vitamines B et du bios (par son origine et son mode d'action). Par tous ses caractères, il se distingue nettement des vitamines B proprement dites.

Il serait intéressant d'observer ce qui se passe dans les milieux naturels qui contiennent déjà des substances actives et d'observer ce qui se produit par adjonction de notre facteur de croissance.

Pour l'observation de nos phénomènes les précautions suivantes sont nécessaires :

- 1° Constituer le milieu de telle sorte qu'il soit déficient (inutilisable pour le champignon); pour ce dernier, il peut être déficient par excès de substances.
- 2° Ensemencer avec une quantité forte de spores; dans les trois premiers jours agiter de temps en temps l'erlenmayer afin de produire un développement homogène; une croûte submergée se produit sur toute la surface du milieu sur laquelle s'élèvent les sporangiophores aériens jaunes et verts. Si l'on n'observe pas ces précautions, le développement se fait par place, à la surface, d'une manière inégale selon les récipients et les résultats ne sont pas comparables entre eux.

Si l'on tient compte de ces précautions, si les conditions extérieures (humidité, température, lumière) sont constantes pour tous les flacons, si la quantité des spores ensemencées est la même pour tous (la souche étant bien entendu la même) les résultats sont rigoureusement comparables et l'on obtient des courbes satisfaisantes. Les mêmes précautions doivent être prises en ce qui concerne la verrerie : récipients de même

forme, de même âge et verre identique pour tous les termes de l'expérience.

On peut nettement conclure à l'existence d'une substance active, de nature vitaminique si la dose à laquelle elle intervient dans le développement est très inférieure à celle du constituant normal le moins abondant dans le milieu. Dans notre cas, c'est l'asparagine, qui est présente à la dose de 0,001 g. par cc. de milieu, dose 1000 fois plus élevée que le poids de l'extrait de levure concentré ajouté (1 γ par cc.). Le rapport entre le poids de matière sèche produite par suite de l'adjonction de cette substance et le poids de cette dernière est extrêmement grand. Avec 17 γ nous obtenons 29 mg. de récolte sèche: rapport: 1700.

Les essais effectués avec des vitamines cristallisées (B¹ et B²) nous ont permis d'élever encore ce rapport (jusqu'à 140,000).

Conclusions.

Nous confirmons l'action des extraits de germes de blé, des extraits de levures, sur la croissance et la sexualité de *Phycomyces*. Cette action peut s'observer sur d'autres Mucorinées, mais d'une façon moins nette.

Les limites d'action pour les extraits concentrés de levures sont de l'ordre de 1 γ par cc. de milieu de culture.

L'hypothèse de l'action primitive d'un ion métallique agissant comme catalyseur de la croissance est très peu probable. Celle d'une substance organique non définie, de nature vitaminique est très probable.

Dans les conditions de nos expériences, l'action de cette substance sur la sexualité n'est pas primaire. Elle semble tout d'abord s'exercer sur le développement végétatif, en milieu liquide et en l'absence de toute manifestation sexuelle. Il est possible qu'il ne s'agisse pas d'une substance unique.

Ouvrages cités.

- Javillier, M. Une cause d'erreur dans l'étude de l'action biologique des éléments chimiques: la présence de traces de zinc dans le verre. *Compte rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, 1914, t. 158, p. 140.
- Lasseur, Ph., et Girardet, F. L'eau pure en biologie. *Bulletin de la Société de chimie biologique de Paris*, 1924, t. 6, p. 314.
- Richards, O. W. The stimulation of yeast growth by thallium a bios impurity of asparagine. *Journ. of biol. Chemistry*, 1932, t. 96, p. 405.
- Schopfer, W. Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez *Phycomyces blakesleanus*. Influence des substances vitaminiques. *Bulletin de la Soc. Bot. Suisse*, 1931, t. 40, p. 87, 1932, t. 41, p. 73.

- Schopfer, W. Recherches sur le facteur de croissance contenu dans le germe de blé. Bulletin de la Soc. Bot. Suisse, 1932, t. 41, p. 335.
- Recherches sur l'action du Thallium sur un champignon. Compte rendu des séances de la Soc. de Physique et d'Hist. naturelle, Genève, 1933, t. 50, p. 90.
- Steinberg, R. A. A study of some factors influencing the stimulative action of Zinc sulphate on the growth of *Aspergillus niger*. I. The effect of presence of Zinc in the cultural glask. Mem. Torrey Bot. Club, 1918, t. 17, p. 287.
- Wesendonck, J. Ueber sekundäre Geschlechtsmerkmale bei *Phycomyces Blakesleeanus* Bgff. Planta, 1930, t. 10, p. 456.
-