

lichen *Cb* aus einer weniger entwickelten Konvektionswolke herauswächst, etwa aus einem *Cumulus congestus* oder gar nur aus einem *Cumulus* geringfügiger Ausmaße^{1, 2}. In diesem Zusammenhang ist es sehr erwünscht, daß Beobachter von Tromben sich durch den fesselnden Anblick des eigentlichen Wirbelschlauches nicht ablenken lassen von der Wahrnehmung der Begleitumstände und namentlich der Detailstruktur der Mutterwolke³. Beginnt die Beobachtung erst, wenn der Wirbelschlauch bereits gebildet ist, so bleiben natürlich die Vorstadien der Mutterwolke unbeachtet. Darauf sollte der Wolkenentwicklung schon bei bloß trombenverdächtigen Wetterlagen ein erhöhtes Augen-

¹ W. KURRIK, Z. f. angew. Met. 42, 19 (1925).

² H. MARKGRAF, Ann. Hydr. u. mar. Met. 57, 14 (1929).

³ Die Internationale Klimatologische Kommission hat den meteorologischen Landesdiensten und Beobachtern eingehende «Richtlinien zur Erforschung von Tromben, Tornados, Wassersäulen und Kleintromben»⁴ empfohlen, welche auch das Studium der Mutterwolke mitberücksichtigen.

⁴ J. LETZMANN, Publ. Sekr. Int. Met. Org. Nr. 38, 91—110 (1939).

merk zugewendet werden; für solche Wetterlagen haben Beobachter in Gegenden mit großer Trombenhäufigkeit oft einen erstaunlich guten Blick.

Summary

KOSCHMIEDER's new thermodynamical theory of tornado formation (1940) makes it probable that a tornado (or a waterspout) develops when a warm air packet rises quickly within the convective mother cloud. In the present paper the three principle cases of conditions are indicated under which supplementary amounts of potential energy necessary to start a "daughter convection" in the cumulo-nimbus cloud can become available in the latter. Supply of moister air from below seems to be at least as important as that one of warmer air. However, the suddenness of the release of the said supplementary energy cannot be explained by the abrupt annihilation of an intercepting layer within the main body of the cumulo-nimbus, for the pre-existence of such a layer is incompatible with the general character of this type of cloud.

Les tests microbiologiques pour la détermination des vitamines

Par W. H. SCHOPFER, Berne

Introduction

Dès la découverte des facteurs accessoires de croissance, que FUNK appela très heureusement «vitamines», s'est avéré la nécessité de mesurer quantitativement leur action. Cette obligation était d'autant plus impérieuse que très tôt on reconnut qu'entre les vitamines et les aliments ordinaires se manifestait une différence fondamentale de nature quantitative et qualitative: ces facteurs accessoires n'agissent pas d'une manière plastique ou énergétique au sens ordinaire de ces expressions. Les doses nécessaires à leur action sont très faibles, comparées à celles qui sont requises pour les glucides, les lipides, les protides ou les sels minéraux. Tout au plus peut-on comparer leur effet avec celui des éléments minéraux à action catalytique (Spurenlemente).

Ainsi, au cours des années et dès 1900, furent mis au point les tests animaux. Le principe théorique d'une mesure d'activité est le suivant: l'animal reçoit un régime constitué par des quantités optimales de glucides, de lipides, de protides, de sels minéraux ainsi que de tous les autres facteurs vitaminiques nécessaires à la croissance normale, sauf la vitamine dont on veut étudier l'action. Il se manifeste une avitaminose s'exprimant par des symptômes variés, en particulier par un ralentissement ou un arrêt de la croissance que l'on peut observer avec de nombreuses vitamines. L'adjonction au régime déficient de la vitamine étudiée, conduira, dans des conditions définies,

à un rétablissement de la croissance et à une guérison de l'avitaminose (béribéri, scorbut, pellagre, etc.).

Tous les traités de vitaminologie exposent en détail les prescriptions à suivre lors de l'utilisation de ces tests. Du point de vue général qui nous intéresse ici, deux faits essentiels sont à retenir: chaque vitamine exerce, dans des conditions données, une *action spécifique*; d'autre part, l'action de la vitamine est *quantitative*. La notion de spécificité doit être envisagée avec prudence. On sait que, chez les microorganismes en particulier, des phénomènes de remplacement d'un facteur par un autre peuvent se manifester.

Pendant plusieurs décennies, les tests animaux furent les seuls à être utilisés. Ils ont permis la mise en évidence, qualitative tout d'abord, puis quantitative, des principales vitamines dans les aliments et dans les produits naturels. Aux mains d'un spécialiste exercé, les tests animaux permettent aujourd'hui la détermination de très faibles quantités de vitamines.

Le recours au test animal est, actuellement encore, indispensable, car, du point de vue pratique, la détermination d'une vitamine se fait du point de vue de l'alimentation *humaine et animale*. Même si les données fournies par d'autres tests paraissent dignes de confiance, il est nécessaire d'effectuer un contrôle et une comparaison avec le test animal.

Nous ne donnons ici aucun détail sur ces tests et sur leurs différentes formes. On les trouve exposés dans tous les traités de vitaminologie.

Les vitamines sont des substances chimiquement définies. Il doit donc être possible de les déterminer par voie chimique. *Les tests chimiques* ont pris une grande extension dès le moment où les vitamines ont été isolées et leur formule de constitution établie. Ils reposent sur la production d'une réaction colorée, visible en lumière ordinaire ou ultra-violette, plus ou moins spécifique, livrée par la vitamine réagissant avec un réactif défini. Perfectionnés et complétés par des méthodes physiques, ils permettent une détermination exacte de très faibles quantités de certaines vitamines.

Une troisième catégorie de tests est actuellement à l'ordre du jour et justifie cet article: ce sont les *tests microbiologiques*. Quelques données théoriques sont nécessaires à la compréhension du problème. Ils se rapportent à la question des vitamines chez les plantes.

Principes théoriques

Très tôt, à l'époque de PASTEUR et de LIEBIG déjà, on reconnaît qu'un microorganisme, champignon ou bactérie, cultivé *in vitro*, hors de son milieu naturel, requiert autre chose que des aliments banaux, organiques et inorganiques. Ces substances particulières furent par la suite appelées «facteurs de croissance». Intuitivement, on comprenait qu'ils devaient présenter des analogies certaines avec les «facteurs accessoires de la croissance» exigés par les animaux. Le problème prend son essor avec le travail fondamental de WILDERS (1901)¹. Dans ce mémoire, l'auteur explique partiellement les désaccords entre les données de PASTEUR et celles de LIEBIG et montre que la culture de la levure *in vitro* nécessite, outre les aliments ordinaires, une substance spéciale, produite par la levure elle-même et à laquelle il donna le nom de «bios». A vrai dire, WILDERS mesurait l'action de cette substance non pas en appréciant la croissance, mais la fermentation déterminée par la levure.

Depuis WILDERS, les recherches se sont multipliées et les méthodes sont devenues plus raffinées. On travaille avec des concentrés hautement purifiés remplaçant les extraits naturels riches en vitamines. De plus en plus, on acquiert la certitude que les facteurs de croissance pour les microorganismes doivent être extrêmement voisins des vitamines dites animales ou humaines.

En 1932², étudiant le champignon *Phycomyces blakesleeanaus*, nous constatons que sur un milieu synthétique pauvre il ne peut pas se développer, quoique celui-ci lui offre du glucose, de l'azote sous forme d'asparagine et les sels minéraux indispensables. Sur un milieu naturel, constitué par de l'extrait de malt, il pousse très bien. Le développement

est excellent si, au milieu synthétique, on ajoute une très petite quantité d'un extrait de levure purifié et très concentré ou d'un extrait de germe de blé concentré riche en vitamines. Nous arrivons à la certitude qu'il doit s'agir d'une vitamine B, B₁ ou B₂, ni l'une ni l'autre n'étant encore connue chimiquement. Enfin, après que WINDAUS et ses collaborateurs¹ eurent isolé la vitamine B₁, antinévrétique, et identifié chimiquement la substance, il nous est possible (1934)² de faire les premiers essais de culture de *Phycomyces* en milieu synthétique avec adjonction de vitamine B₁ (aneurine ou thiamine) pure: cette vitamine est effectivement le facteur de croissance nécessaire à *Phycomyces*, sans lequel le microorganisme ne peut se développer. Cette vitamine est présente dans les produits naturels utilisés, germe de blé, levure, malt, extrait de fruit, etc., ce qui confère au milieu préparé avec ces substances ses propriétés auxogènes. En un mot, le pont est établi entre la physiologie animale et végétale: une vitamine dite animale est l'équivalent du facteur de croissance de microorganisme. Depuis 1934, comme nous le verrons plus loin, les principales vitamines requises par l'homme et les animaux supérieurs sont des facteurs de croissance pour les microorganismes (fig. 1, fig. 2).

Ce fait bien établi allait avoir une portée théorique considérable. Dès le début de la vitaminologie, c.-à-d. le début du siècle, le fait fut établi qu'en prin-

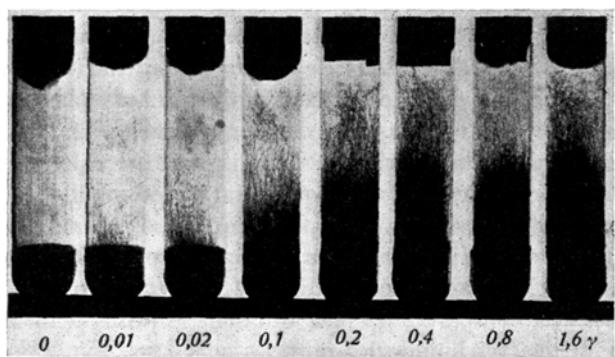


Fig. 1. Développement de *Phycomyces* en fonction de doses croissantes d'aneurine, indiquées en γ pour 25 cm. de milieu gélosé. Optimum vers 0.4γ . (D'après SCHOPFER, Erg. Biologie 1939.)

cipe seules les plantes supérieures étaient capables de synthétiser à partir des éléments, du gaz carbonique et de l'eau, ces catalyseurs indispensables. Elles les fournissent à l'homme et aux animaux qui ne savent pas les fabriquer. Si donc des microorganismes requièrent une ou plusieurs vitamines, c'est qu'ils réagissent comme une cellule animale et qu'ils ont perdu le pouvoir d'en faire la synthèse. La perte du

¹ A. WINDAUS, R. TSCHESCHE, H. RUHKOPF, F. LAQUER, Nachr. d. Ges. der Wiss. Göttingen III, 342 (1932).

² W. H. SCHOPFER, Arch. f. Mikrobiol. 5, 513 (1935). C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 51, 26 (1934).

¹ E. WILDERS, La Cellule 18, 313 (1940).

² W. H. SCHOPFER, Bull. Soc. bot. suisse 40, 87 (1931); 41, 73 (1932).

pouvoir de synthèse détermine le besoin et déclanche une avitaminose végétale primitive. Chez le microorganisme et chez l'animal ou l'homme, l'avitaminose est, dans son caractère fondamental, identique : elle est déterminée par un trouble du métabolisme cellulaire, causé lui-même par l'absence, dans l'édifice cytoplasmique, d'un ou plusieurs constituants. Il en résulte des perturbations primaires fondamentales du

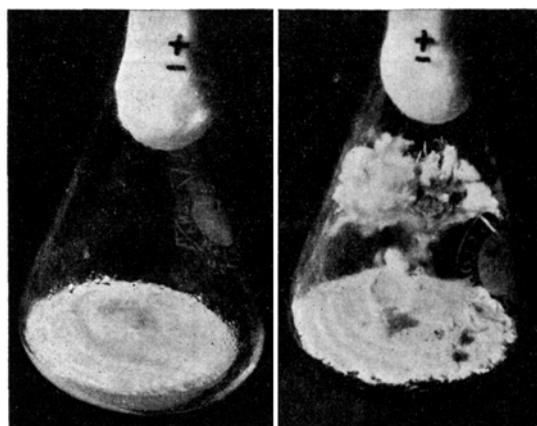


Fig. 2. *Schizophyllum commune*. A gauche les deux sexes + et — sans pyrimidine, à droite avec la pyrimidine de l'aneurine. Remarquer la production du carpophore dicaryotique. (D'après SCHOPFER et BLUMER, *Protoplasma* 1940.)

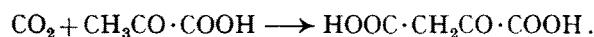
métabolisme cellulaire. Chez un pluricellulaire hautement différencié ces troubles s'exprimeront non seulement par des anomalies de la croissance, mais retentiront dans toute la morphologie de l'organisme, déterminant ainsi les symptômes caractéristiques de chaque avitaminose. Chez un microorganisme unicellulaire ou un champignon inférieur peu différencié, l'avitaminose ne pourra s'exprimer que de la manière la plus simple et la plus primitive, c.-à-d. par un arrêt de la croissance. L'adjonction au milieu de la vitamine manquante permettra à la croissance de se déclencher ou de reprendre.

Le principe des pertes de pouvoir de synthèse, développé par FILDES, LWOFF, SCHOPFER, KNIGHT, ONDRATSCHEK, est à la base du problème des facteurs de croissance de microorganismes.

L'identité des avitaminoses végétales et animales est profonde. Elle s'exprime dans l'acte métabolique primaire auquel la vitamine doit prendre part. Ainsi, dans l'avitaminose B_1 humaine et animale, on sait qu'il se produit une accumulation d'acide pyruvique déterminée par l'absence ou l'insuffisance de l'aneurine qui ne peut plus décarboxyler ce produit intermédiaire du métabolisme. Chez *Phycomyces* en hypovitaminose, c.-à-d. avec une quantité insuffisante de vitamine B_1 , HAAG¹ a montré que l'on retrouve également de l'acide pyruvique dans le milieu. L'iden-

tité des deux groupes d'avitaminoses, végétales et animales, existe également pour l'acide nicotinique ou la nicotinamide, pour la lactoflavine et pour toutes les vitamines dont la fonction dans le métabolisme nous est connue.

Cette identité devient compréhensible et évidente, si nous nous rappelons que les vitamines essentielles qui seront évoquées ici, sont des coenzymes ou des fragments de coenzymes. L'aneurine (vitamine B_1) phosphorylée fonctionne comme cocarboxylase¹. Elle participe à la décarboxylation et à la deshydrogénéation² de l'acide pyruvique. Il est aussi très probable que l'aneurine phosphorylée constitue le groupe actif de ferments permettant la carboxylation, c.-à-d. l'introduction de CO_2 dans d'autres substances. C'est p. ex. le cas lorsque l'acide oxaloacétique se forme à partir de CO_2 et de l'acide pyruvique³



L'acide oxaloacétique est une étape du cycle de l'acide citrique et de l'acide succinique.

L'aneurine participe encore à d'autres réactions. La lactoflavine (vitamine B_2 s. str.) est le groupe actif d'un ferment respiratoire (ancien ferment jaune). Elle est un constituant d'un alloxazino-nucléotide fonctionnant comme coferment (mononucléotide). Elle fait partie de di-nucléotide à base d'alloxazine et d'adénine (diaphorase, xanthinoxidase). La nicotinamide est le groupe actif de codéhydrases à base de nicotinamide, de ribose, d'acide phosphorique et d'adénine (di- et triphosphopyridinonucléotides). Nous ne savons encore rien du rôle exact de l'adermine (vitamine B_6), de l'acide pantothélique et de la biotine (vitamine H), si ce n'est qu'elles aussi se trouvent dans les cellules des deux règnes, surtout liées à un support protidique, beaucoup moins à l'état libre. Il est probable qu'elles doivent également fonctionner comme coenzymes.

Les vitamines énumérées ci-dessus sont réparties d'une manière universelle et, selon toute apparence, sont nécessaires au fonctionnement de toutes les cellules. On comprend ainsi que la perte de pouvoir de synthèse, qui peut affecter aussi bien le cytoplasme d'une bactérie, d'un champignon, de cellules embryonnaires de plantes supérieures, que celui des tissus animaux et humains, conduit à la même perturbation fondamentale.

Ces constatations, qui sont du domaine de la physiologie générale, sont les éléments d'un problème des plus importants, dont la portée philosophique est in-

¹ K. LOHMANN und PH. SCHUSTER, Naturwissenschaften 25, 26 (1937).

² F. LIPMANN, Nature 140, 25 (1937).

³ H. G. WOOD and C. H. WERKMAN, Biochem. J. 34, 7 (1940); J. Biol. Chem. 119, 309 (1941); F. LEUTHARDT et B. GLASSON, Helv. Physiol. Acta I, 221 (1943).

discutable. Ce problème qui a déjà été évoqué ailleurs¹, ne sera pas discuté ici plus en détail. Nous conclurons simplement en disant que la définition classique de la vitamine envisagée «comme substance indispensable à la cellule animale et fournie à celle-ci par la cellule végétale» n'a plus cours et doit être considérablement étendue. La vitamine ou facteur de croissance est une substance organique agissant à dose très faible, ne prenant pas part à l'édification massive du cytoplasme, mais représentant tout de même un constituant essentiel de ce dernier, et fonctionnant généralement comme coenzyme ou fragment de coenzyme. Lorsque la cellule, animale ou végétale, a perdu le pouvoir d'en faire la synthèse, nous parlons d'un *exofacteur*, qui doit être ajouté au milieu ou au régime. Lorsque la cellule sait en faire la synthèse, nous parlons d'un *endofacteur*. Endofacteurs et exofacteurs assument la même fonction dans le cytoplasme. Cette définition exclut les catalyseurs minéraux de même que les aliments organiques plastiques et énergétiques dont le pouvoir de synthèse à partir des éléments est également perdu par les cellules végétales hétérotrophes et par les cellules animales.

Cet exposé, qui a trait aux tests microbiologiques, ne traitera que des aspects pratiques et techniques du problème. Leur compréhension nécessite encore une courte discussion relative au mode d'action du facteur de croissance vitaminique et aux modalités des pertes de pouvoir de synthèse.

Mode d'action du facteur de croissance

Le facteur de croissance pour microorganismes agit quantitativement. Dans des conditions données et dans des limites propres à chaque organisme et dépendant également du milieu, l'action, mesurée par l'intensité du développement, est proportionnelle à la dose de facteur vitaminique présente. Au delà de la dose optimale, toute adjonction supplémentaire est sans action. Elle peut avoir un effet inhibiteur (voir fig. 1).

D'autre part, la spécificité d'action du facteur vitaminique est généralement très marquée. Des études très détaillées ont été faites à ce sujet avec l'aneurine, la lactoflavine, l'acide nicotinique, l'adermine, l'acide pantothenique et la biotine. Cette spécificité s'exprime par le fait qu'une seule substitution, en apparence peu importante, inactive la molécule et la rend impropre à exercer son effet. Nous ne citerons qu'un cas, celui de l'inositol, d'autant plus frappant qu'il ne s'agit pas d'un facteur essentiel, mais d'un facteur complémentaire. La spécificité d'action de cette substance a déjà été partiellement étudiée pour la levure par WOOLLEY,

LASH MILLER, KÖGL et VAN HASSELT. Nous avons trouvé que le mésoinositol est un facteur complémentaire, non nécessaire pour une souche de *Rhizopus stalinus*, dont il augmente temporairement la production de matière vivante sèche. Le tableau suivant montre la nature de la spécificité¹.

Tableau 1

Substance	Dose	Détermination après	Augmentation du poids sec
1) Méso-inosite 	200 γ	4 jours	+ 67,21%
2) Scyllite 	100 γ 1000 γ	3 jours 3 jours	+ 9 % - 7,1 %
3) Mytilite (méthyl-scyllite) 	300 γ	4 jours	+ 7,87 %
4) Iso-mytilite (méthyl-méso-inosite) 	300 γ	4 jours	+ 10,16 %
5) Oxy-mytilite 	100 γ	4 jours	- 1,72 %
6) Oxy-iso-mytilite 	100 γ	4 jours	+ 1,32 %

¹ A. LWOFF, 1er Congrès des microbiologistes de langue française, Paris, pp. 58—95 (1938); W. H. SCHOPFER, Erg. Biol. 16, 1—172 (1939); W. H. SCHOPFER, Mitt. Nat. Ges. Bern, pp. 73—103 (1942); P. KARRER, W. H. SCHOPFER, Schweiz. Z. Pathol. Bakt. 7, 303 (1944).

¹ W. H. SCHOPFER, Helv. chim. Acta 27, 468 (1944).

Les formules de constitution sont dues à TH. POSTERNAK.

On voit que seul le mésoinositol exerce une action temporaire marquée, liée très probablement à la présence de 3 OH voisins en cis. Seule l'isomyltilite, possédant cette caractéristique, mais ayant en plus un groupe CH_3 , manifeste une très faible activité.

Pour toutes les vitamines étudiées la spécificité d'action est aussi stricte. Elle est sans aucun doute en rapport avec la fonction de coenzyme de ces substances.

fester des besoins très différents. *Phycomyces* requiert l'aneurine tandis que *Mucor mucedo* la synthétise (SCHOPFER). *Strigomonas fasciculata* requiert l'hématine alors que *S. oncopelti* la synthétise (LWOFF)¹. Le cas le plus frappant est représenté par un organisme levuriforme, *Candida Guillermontii* qui ne peut pas assimiler les nitrates et requiert la biotine, tandis que la variété *nitratophila* assimile les nitrates et synthétise la biotine². Malgré cette polytopicité générale, ce sont avant tout les organismes hétérotrophes en général, saprophytes et parasites qui sont plus ou moins auxo-hétérotrophes.

Les pertes de pouvoir de synthèse peuvent être fractionnées. Elles n'atteignent pas forcément la molécule complète de la vitamine en question. Une levure rouge, *Rhodotorula rubra*, requiert la pyrimidine de l'aneurine et synthétise le thiazol (SCHOPFER)³ tandis que *Mucor Ramannianus* exige le thiazol et synthétise la pyrimidine (MÜLLER et SCHOPFER)⁴.

L'acide pantothénique est formé par la condensation de la β -alanine et de l'acide α, γ -dioxy- β -diméthylbutyrique. *Corynebacterium diphtheriae* exige la β -alanine⁵ tandis qu'*Acetobacter suboxydans* requiert l'autre constituant (UNDERKOFER, BANTZ et PETERSON)⁶. La nicotinamide est facteur de croissance pour *Staphylococcus aureus* (KNIGHT)⁷. Elle participe très probablement à la constitution de la molécule de cozymase (diphosphopyridino-nucléotide) qui est réclamée à titre de molécule complète par *Hemophilus parainfluenzae*. Elle représente pour ce microorganisme l'ancien facteur V. comme A. et M. LWOFF l'ont démontré en 1936⁸. Ce principe est certainement susceptible d'une application générale. Il nous permet de comprendre une étape des biosynthèses de ces vitamines.

Les pertes de pouvoir de synthèse sont en relation avec la composition du milieu nutritif. Une modification qualitative de la source azotée p. ex. peut modifier le degré de l'auxo-hétérotrophie. *Trichophyton album*, cultivé en présence d'asparagine, se passe de biotine, qu'il synthétise réellement⁹. En présence de citrate d'ammonium, la biotine est requise comme facteur complémentaire et est nécessaire pour un développement optimal. Ce principe est valable avant tout pour les cas d'auxo-hétérotrophie partielle que l'on peut ainsi faire varier dans de larges limites.

¹ A. LWOFF, Zbl. Bakter. I Orig. 130, 498 (1933/34).

² W. H. SCHOPFER, C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 61, 147 (1944).

³ W. H. SCHOPFER, C. R. Acad. Sci. Paris 205, 445 (1937).

⁴ W. MÜLLER et W. H. SCHOPFER, C. R. Acad. Sci. Paris 205, 687 (1937).

⁵ H. J. MÜLLER and S. COHEN, J. Bacter. 34, 381 (1937).

⁶ L. A. UNDERKOFER, A. C. BANTZ and W. H. PETERSON, J. Bacter. 45, 183 (1943).

⁷ B. C. J. G. KNIGHT, Biochem. J. 31, 731 (1937).

⁸ A. et M. LWOFF, C. R. Acad. Sci. Paris 203, 520 (1936).

⁹ W. H. SCHOPFER et S. BLUMER, Ber. Schweiz. bot. Ges. 53, 409 (1943).

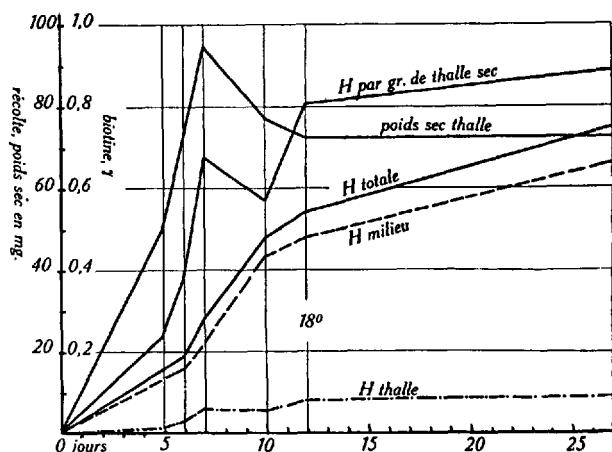


Fig. 3. Synthèse de la biotine (vitamine H) par *Phycomyces* en présence d'aneurine. Remarquer la diffusion progressive dans le milieu. (D'après SCHOPFER, Z. f. Vitaminforschung 1943.)

Modalités des pertes de pouvoir de synthèse

Les microorganismes qui ont perdu le pouvoir de synthèse pour une ou plusieurs vitamines sont une minorité. Nous les appelons auxo-hétérotrophes, par opposition aux auxo-autotrophes. L'auxo-hétérotrophie est indépendante de l'hétérotrophie en général. *Phycomyces* est hétérotrophe en général (saprophyte): il est auxo-hétérotrophe pour l'aneurine qu'il requiert, mais fortement auxo-autotrophe pour la biotine (vitamine H) qu'il fabrique en grande quantité¹ et accumule dans son milieu (voir fig. 3). La biosynthèse de la biotine a été étudiée chez ce champignon à l'aide d'un test microbiologique (levure). *Eremothecium Ashbyii*, parasite du cotonnier, est également hétérotrophe. Il est auxo-hétérotrophe pour la biotine, l'aneurine et le mésoinositol qu'il requiert, mais auxo-autotrophe pour la lactoflavine qu'il fabrique en quantité si élevée qu'il faut presque la considérer comme un produit d'excrétion.

Les pertes de pouvoir de synthèse sont polytopiques. Nous voulons dire par là qu'elles affectent les organismes indépendamment de leur position systématique. Des organismes très voisins peuvent mani-

¹ F. KÖGL und N. FRIES, Z. Physiol. Chem. 249, 93 (1944); W. H. SCHOPFER, C. R. Acad. Sci. Paris 199, 1656 (1934); Z. f. Vitaminforschung 14, 42 (1943).

Les pertes de pouvoir de synthèse peuvent être multiples. Les organismes ne réclamant qu'une vitamine comme facteur de croissance sont la minorité. Une constellation plus ou moins complexe est exigée, selon le degré de l'auxo-hétérotrophie. La levure (*Saccharomyces cerevisiae*) requiert pour un développement optimal: l'aneurine, le mésoinositol, la β -alanine, l'acide pantothenique, l'adermine et la biotine. La constellation de *Streptobacterium plantarum*, étudiée par MÖLLER, est plus complexe encore¹.

Les substances suivantes sont actuellement reconnues comme facteurs de croissance vitaminiques pour les microorganismes: la *pyrimidine* et le *thiazol* de l'aneurine; l'aneurine; le *mésoinositol*; la β -alanine; l'acide α, γ -dioxy- β, β -diméthylbutyrique; l'acide *pantothenique*; la *lactoflavine*; l'acide *nicotinique* et la *nicotinamide*; l'adénine; la *cozymase*; l'uracile; l'hypoxanthine; l'adermine (vitamine B₆); la biotine (vitamine H); l'acide pimélique; l'acide ρ -aminobenzoïque; l'acide ascorbique; le cholestérol; l'hémine.

Pour l'instant, seules les vitamines hydrosolubles, avant tout celles du groupe B, peuvent être déterminées à l'aide d'un test microbiologique. Nous avons indiqué en italique, dans la liste ci-dessus, les vitamines qui ont donné lieu à l'établissement d'un test utilisable. Pour les vitamines liposolubles, il n'existe pas encore de test praticable.

Sur la base de ces faits expérimentaux et de ces données théoriques, nous pouvons comprendre comment les tests microbiologiques se sont développés au cours de ces dix dernières années et les évaluer critiquement.

Le test microbiologique du point de vue pratique

Le principe est des plus simples. Soit un organisme incultivable sur un milieu synthétique dont tous les constituants sont aussi purs, chimiquement, que possible. Il a été établi que cet organisme ne requiert pour son développement qu'une vitamine déterminée. Nous connaissons la dose minimale nécessaire pour déterminer le départ du développement, ainsi que la dose optimale, à partir de laquelle toute adjonction de vitamine est sans effet. L'action de la vitamine est bien quantitative. En graduant les doses, du minimum à l'optimum, nous obtenons, après une durée déterminée, des productions de matière vivante proportionnelles à la dose de vitamine présente. Les poids s'ordonnent selon une courbe caractéristique.

Soit une substance naturelle, lait, extrait végétal ou animal dont on veut déterminer le taux en vitamine. L'expérience a montré que l'adjonction d'une petite quantité de substance au milieu synthétique permet la croissance et la multiplication cellulaire:

c'est donc que la vitamine en question s'y trouve. A l'aide de doses croissantes de la substance à titrer, nous établissons une nouvelle courbe. Les deux courbes indiquent la croissance en fonction de la concentration de la vitamine. En comparant la courbe standard, obtenue sur milieu synthétique + doses croissantes de vitamine avec celle fournie par le milieu + substance à titrer, il sera possible de se faire une idée sur le taux en vitamine de cette dernière. Lorsque les conditions requises sont réalisées, un calcul précis de ce taux est possible.

Nous nous proposons d'étudier rapidement les principaux tests microbiologiques en usage aujourd'hui. L'étude du test *Phycomyces* pour l'aneurine nous introduira dans la pratique de la méthode.

Le test Phycomyces pour la détermination de l'aneurine (vitamine B₁)

Phycomyces blakesleeanus est une Mucorinée (Phycocyste) produisant dans un milieu liquide un thalle submergé, sur lequel se développent des longs sporangiophores aériens munis de leurs sporanges. Les cultures se font en principe sur 25 ccm de milieu synthétique à la température de 22° C. Après 7–10 jours, le développement maximum est atteint.

Soit un milieu synthétique constitué par 30 g. de glucose, 1 g. d'asparagine, 0,5 g. de MgSO₄·7 H₂O, 1,5 g. de KH₂PO₄ par litre d'eau distillée¹. Les constituants, particulièrement les substances organiques, doivent être aussi purs que possible. Le milieu est réparti dans des Erlenmeyers de 150 ccm en verre d'Iéna contenant chacun 25 ccm de liquide. La stérilisation se fait à 115° C. pendant 20 minutes. L'expérience est divisée en 6 séries. Chacune de celles-ci contient des volumes croissants de solutions d'aneurine à taux différents: 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 γ par ccm. Sur l'abscisse de la figure 4 sont portés les volumes de 0,1 à 4 ccm. ainsi que les poids d'aneurine correspondant à la solution à 0,4 γ/ccm. L'aneurine est stérilisée avec le milieu. Après refroidissement, chaque flacon reçoit 0,1 ccm d'une suspension lavée de spores fournies par une culture sur milieu naturel. Après une semaine, les thalles sont extraits, séchés à 100° C. et pesés à la balance analytique. Les poids obtenus sont portés sur papier millimétré. Nous obtenons le faisceau de courbes indiqué par la figure 4. Considérons sur cette dernière les courbes livrées par les solutions à 0,05 et 0,1 γ/ccm (a et b). Le rapport des dilutions des solutions d'aneurine est de 2. Or, nous constatons sur le graphique qu'entre les volumes des deux solutions nécessaires pour obtenir les mêmes poids de thalle, le rapport est également de 2. Avec 1 ccm de la solution à 0,1 γ/ccm, nous obtenons le même poids qu'avec 2 ccm de la solution à 0,05 γ/ccm.

¹ E. F. MÖLLER, Z. Physiol. Chem. 254, 285 (1938); Angew. Chemie 53, 204 (1940).

¹ W. H. SCHOPFER, Z. f. Vitaminforschung 4, 67 (1935).

Considérons la courbe *a* ($0,05 \gamma/\text{ccm}$) comme étant fournie par des volumes croissants d'une substance à titrer. Des poids de thalle identiques étant obtenus avec:

sol. B_1	0,1 γ/ccm :	0,1	0,5	1 ccm
sol. à titrer:		0,2	1,0	2 ccm

il est clair que la solution de titre inconnu sera 2 fois moins concentrée que la solution d'aneurine à $0,1 \gamma/\text{ccm}$: son taux sera de $0,05 \gamma/\text{ccm}$. Il est naturellement rare que la concordance soit si exacte. Grâce au papier millimétré, partant de la courbe standard, ici celle correspondant à $0,1 \gamma/\text{ccm}$, il sera facile de déterminer graphiquement, avec une précision de 0,001 ccm,

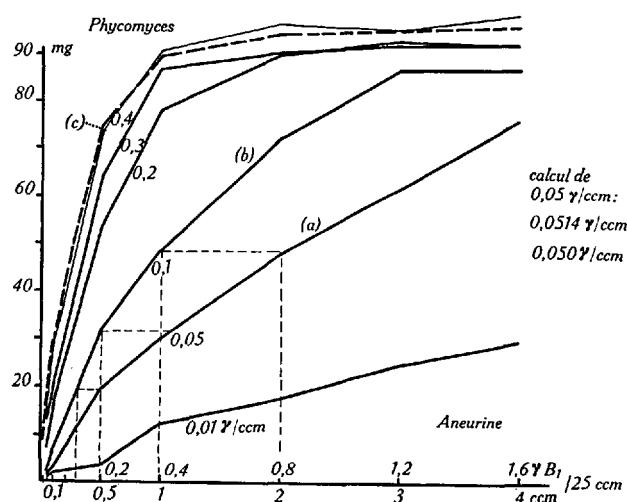


Fig. 4. Développement de *Phycomyces* en présence de volumes croissants de solutions à taux variables en aneurine. En pointillé, courbe moyenne. Le taux de la solution donnant la courbe *a*, calculé d'après *b*, est de $0,05 \gamma/\text{ccm}$, d'après *c* de $0,0514 \gamma/\text{ccm}$.

les volumes de solution à titrer livrant les mêmes poids que les volumes connus de la solution standard. Il faut insister sur le fait que pour chaque expérience les courbes standards sont quelque peu différentes. La reproductibilité n'est pas absolue, quantitativement. Il est impossible de construire une fois pour toutes une courbe de référence valable pour une série d'expériences, mais chaque fois une nouvelle série standard doit être effectuée.

Les courbes de la figure 4 sont obtenues avec un nombre restreint de points. Il est possible également de porter sur une seule courbe tous les points fournis par les 6 séries. Cette courbe (*c*) sera plus régulière et permettra également un calcul précis, à condition de n'être pas trop éloignée de la courbe fournie par la solution à titrer.

La méthode a été utilisable dès le moment où, avec A. JUNG¹, des comparaisons ont été faites avec les

résultats fournis par le test animal (rat). Le tableau suivant indique quelques résultats.

Tableau 2

Produit	Unités internationales par g.	
	Rat	Phycomyces
1. Concentré de B_1 Roche	2909/4	625 500
2.	3163/4	2 050 2 000
3.	3163/6	10 000 11 400
4.	3163/8	30 000 27 000
5. Extrait de levure Wander		
N.C. 2	32	35-40
6.	A.C. 2	7 4
7.	N.C. 4	1,6 1-1,5
8.	A.C. 4	5-7 10-12
9. Extrait de levure autoclavé et séché	0	10
10. Extrait de germes de blé concentré	5,3-6	6,8

Les concordances, exprimées ici en unités internationales, sont relativement satisfaisantes. Pour les produits 6 et 8 elles ne le sont pas. Avec le produit 12, actif sur *Phycomyces*, l'animal ne réagit pas. Il s'agit là d'un cas exceptionnel, expliqué de la manière suivante: nous admettons que sous l'action de l'autoclavage prolongé la vitamine B_1 , présente dans l'extrait de levure, a été scindée en ses constituants, actifs sur le champignon, mais pas sur l'animal. Depuis 1936, la méthode a été fortement améliorée et les concordances sont aujourd'hui plus satisfaisantes.

L'examen de la figure 4 se rapportant à des cultures faites avec 25 ccm de milieu contenant 1 g % d'asparagine, atteste qu'une dose de $0,01 \gamma$ d'aneurine peut encore être décelée ($1:2,5 \cdot 10^9$). En augmentant la dose d'asparagine du milieu à 2 et 4 g %, la sensibilité sera fortement augmentée (voir page 192). D'autre part, la méthode, qui a l'avantage de réclamer très peu de substance pour l'analyse, peut être raffinée et transformée en microméthode, si l'on emploie 2,5 ou même 1 ccm de milieu (SCHOPFER et JUNG¹). La limite inférieure peut être reportée à 0,001 γ .

Les chiffres fournis par le test indiquent-ils uniquement l'aneurine? Le microorganisme ne réagit-il qu'à la présence de la vitamine B_1 seule? Il faut envisager les problèmes suivants pour pouvoir répondre à cette question: 1^o quelle est la spécificité d'action de l'aneurine sur *Phycomyces* et sur l'animal test, 2^o existe-t-il des analogues ou homologues de l'aneurine agissant sur le champignon, 3^o existe-t-il d'autres facteurs vitaminiques ajoutant leur effet à celui de la vitamine B_1 , 4^o quelle est l'action des aliments plastiques et

¹ W. H. SCHOPFER et A. JUNG, Z. f. Vitaminforschung 7, 143 (1938).

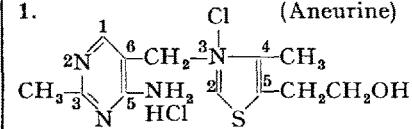
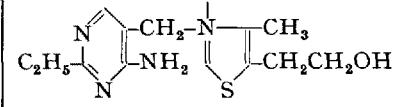
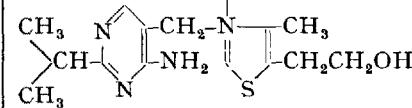
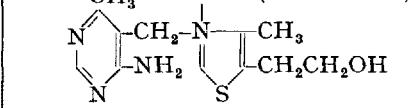
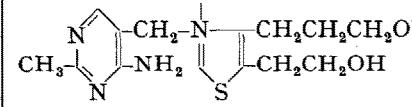
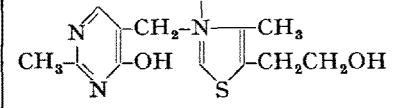
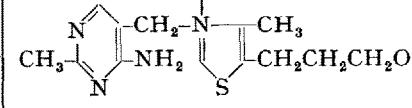
W. H. SCHOPFER et A. JUNG, 5^e Congrès intern. techn. et chim. des industries agricoles, Schéveningue p. 22, (1937).

énergétiques, azote surtout, contenus dans la substance à titrer, 5° quelle est l'action des catalyseurs minéraux certainement présents dans cette dernière?

Spécificité d'action de l'aneurine

Le tableau indique les résultats obtenus avec les mêmes produits de substitution de l'aneurine, agissant sur *Phycomyces* (SCHOPFER¹) et sur le pigeon (SCHULTZ²).

Tableau 3

Produit	Action sur	
	Phyco- myces	Pigeon
1.  (Aneurine)	1	1
2. 	1,18	1,19
3. 	0	0,31
4. 	0,001	0,0002
5. 	0,0036	0,0028
6. 	0	0
7. 	0	0

On voit que pour les deux tests une substitution en 5 de la pyrimidine ou en 5 du thiazol inactive complètement la molécule. Avec satisfaction nous constatons

que l'éthylaneurine (N° 2) dont nous avions montré en 1938¹ qu'elle était plus active sur *Phycomyces* que l'aneurine ordinaire a le même effet sur le pigeon (SCHULTZ). Dans ses grandes lignes, la spécificité d'action est identique avec les deux tests, ce qui est un argument de plus en faveur du test microbiologique. Les doses de produits de substitution inactives sur *Phycomyces* sont celles qui correspondent à la dose optimale de l'aneurine normale. En élévant fortement la dose des homologues faiblement actifs, on peut conférer à ceux-ci une certaine action, surtout, si des catalyseurs métalliques sont présents. Mais il est très improbable que de tels homologues et analogues existent à taux élevés dans la nature. C'est donc bien l'aneurine seule qui agira. La forme active est représentée par l'éther phosphorique de l'aneurine fonctionnant comme cocarboxylase: elle agit sur le test *Phycomyces* au même titre que l'aneurine. D'autre part l'aneurine présente dans les produits naturels ne se trouve qu'en petite partie sous forme libre. Il se manifeste entre l'aneurine et le thalle de *Phycomyces* une extrême affinité permettant au microorganisme de retirer la vitamine d'un adsorbat². Le champignon indique la valeur en aneurine totale (aneurine, acétyl-aneurine, disulfide d'aneurine). Il réagit à la présence de l'aneurine libre, sous forme d'éther phosphorique et sous forme adsorbée. Le résultat fourni par le test correspondra donc à la valeur vitaminique totale — ou presque — du produit analysé, ce qui lui confère une valeur indiscutable. Cet examen nous permet de répondre à la seconde question: il n'existe pas, dans l'état actuel des recherches, d'analogues ou d'homologues susceptibles de fausser les résultats indiqués par le test *Phycomyces*.

Autres facteurs vitaminiques actifs sur *Phycomyces*

Aucune des vitamines connues n'est exigée par le champignon ou n'ajoute son effet à celui de l'aneurine. Dès le début des recherches dans ce domaine, nous avons remarqué qu'un produit riche en aneurine autoclavé en milieu alcalin de telle sorte qu'il en résulte une destruction de la molécule de vitamine B₁ manifestait encore une activité résiduelle. Nous avons admis un facteur MP., groupant des substances favorables, mais non essentielles, thermostables, adsorbables par le noir animal et plus ou moins alcalistables.

Le champignon *Phytophthora cinnamomi* exige la molécule complète d'aneurine³. *Phycomyces* se contente des deux fractions de cette molécule, pyrimidine (2-méthyl-4-amino-5-aminométhyl-pyrimidine) et thia-

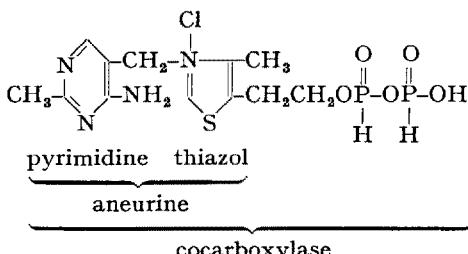
¹ W. H. SCHOPFER, C. R. 1er Congrès des microbiologistes de langue française, Paris, p. 28 (1938).

² W. H. SCHOPFER, C. R. Soc. Physique Hist. nat. Genève 53, 1 (1936).

³ W. J. ROBBINS, Bull. Torrey Bot. Club 65, 267 (1938).

zol (4-méthyl-5- β -hydroxyéthyl-thiazol). Des doses équimoléculaires des deux constituants remplacent la quantité correspondante d'aneurine (SCHOPFER et JUNG¹, SINCLAIR², ROBBINS et KAVANAGH³, BONNER et ERIKSON⁴).

Tableau 4



Pyrimidine et thiazol sont beaucoup plus thermosables que l'aneurine. Il se pourrait donc qu'un mélange de P+T constitue, en partie, le facteur MP., si ces produits existent, préformés, dans la nature.

Des recherches effectuées avec MÜLLER⁵ et HURNI⁶, relatives à l'action de l'autoclavage sur la stabilité de l'aneurine ont mis en évidence des faits singuliers, non encore complètement expliqués. Un autoclavage à 130°C., en milieu alcalin, détruit rapidement la vitamine B₁. Cette destruction est retardée par la présence de substances ballasts, amidon, glucose. Une solution d'aneurine pure, chauffée à 130°C. dans des récipients en verre d'Iéna, perd toute son activité après 30 minutes, le pH passant de 6 à 9 (probablement par suite d'une libération d'ions alcalins par le verre). Ces phénomènes ne s'observent pas, si le chauffage se fait en flacons de quartz. Après 30 minutes d'autoclavage dans ces conditions, le test chimique permet de déceler encore 75% de l'aneurine initiale et le test *Phycomyces* 100%. Il est donc probable que 25% de l'aneurine ont été scindés en pyrimidine et thiazol, actifs sur le champignon. Il faut un chauffage très prolongé, en récipients de quartz, pour détruire complètement la vitamine. On voit donc qu'il faut interpréter prudemment les expériences de désintégration thermique. Nous comprenons maintenant pourquoi un autoclavage prolongé et suffisant, mais non excessif, inactive la substance pour l'animal qui exige la molécule complète de vitamine B₁, alors que l'action persiste sur le champignon. Mais, même si l'autoclavage a produit une transformation de l'aneurine en pyrimidine et thiazol, une détermination à l'aide du test

Phycomyces sera tout de même possible, puisque le microorganisme réagit à la présence des trois substances. Une détermination serait impossible et les taux fournis sans signification pour l'alimentation humaine, si la solution du produit contenait, préformées, des doses suffisantes de pyrimidine et de thiazol, ce qui n'est pas prouvé.

ROBBINS et KAVANAGH (1942)¹ ont montré que l'hypoxanthine fonctionnait comme facteur de croissance pour *Phycomyces*. Ces résultats ont été confirmés par H. HURNI² qui montre qu'effectivement cette substance détermine une accélération de la germination des spores et produit par là une accélération temporaire du développement. Dans ce cas, l'hypoxanthine doit être considérée comme un facteur complémentaire temporaire, actif et utile mais non indispensable. L'accélération est finalement compensée et, après 5 jours, on ne relève plus de différence entre les cultures avec hypoxanthine et les contrôles. Les résultats finaux du test ne peuvent être modifiés par cette substance (voir fig. 5).

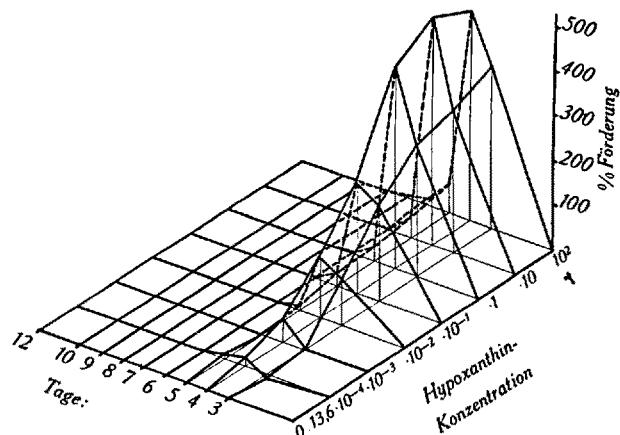


Fig. 5. Action de l'hypoxanthine sur *Phycomyces* en fonction de la concentration et du temps. L'action est indiquée en augmentation en % par rapport aux contrôles. (D'après HURNI, Z. f. Vitaminforschung 1945.)

Toutes les autres vitamines pures utilisées: mésoinositol, β -alanine, acide pantothenique, lactoflavine, acide nicotinique et nicotinamide, adénine, cozymase (préparation impure!), adermine³, biotine, acide pimélique, acide p-aminobenzoïque sont sans action. BANG⁴ a indiqué un effet de la biotine, reposant certainement sur la présence de l'aneurine comme impureté. Des échantillons purs de biotine synthétique d,l- β -biotine) sont sans action⁵. Dans l'état

¹ W. H. SCHOPFER et A. JUNG, C. R. Acad. Sci. Paris 204, 1500 (1937).

² H. M. SINCLAIR, Nature (London) 140, 360 (1937).

³ W. J. ROBBINS et F. KAVANAGH, Proc. Nat. Acad. Sci. 23, 499 (1937).

⁴ J. BONNER et J. ERIKSON, Amer. J. Bot. 25, 685 (1938).

⁵ W. H. SCHOPFER et W. MÜLLER, C. R. Soc. Biol. Paris 128, 372 (1938).

⁶ W. H. SCHOPFER et H. HURNI, Actes Soc. helv. sci. nat., p. 123 (1942).

¹ W. J. ROBBINS and F. KAVANAGH, Proc. Nat. Acad. Sci. 28, 4 (1942).

² H. HURNI, Z. f. Vitaminforschung 16, 69 (1945).

³ A. JUNG und W. H. SCHOPFER, Verh. Ver. schweiz. Physiol., Febr. (1942).

⁴ H. O. BANG, B₁-Vitaminstudier ved hjælp af *Phycomyces*-metoden, København (1944).

⁵ W. H. SCHOPFER, Z. f. Vitaminforschung 14, 42 (1943).

actuel de nos connaissances on peut dire que seule l'aneurine est facteur essentiel pour *Phycomyces*. Il n'est pas exclu que l'on découvre encore d'autres facteurs actifs sur ce microorganisme.

J. MEIKLEJOHN¹ montre qu'un «facteur adjuvant» est présent dans le centre du tubercule de la pomme de terre, entre avril et août. A la périphérie, il agit pendant toute l'année. Il n'exerce son effet qu'en présence d'un excès d'aneurine. L'effet adjuvant n'est pas dû à un excès d'azote! Ce phénomène étant connu, il ne peut empêcher l'utilisation du microorganisme comme test.

Pour être tout à fait prudent, nous dirons que le résultat livré par le test indique la totalité des facteurs agissant sur *Phycomyces*, étant entendu que dans la majorité des cas, c'est à l'aneurine qu'est dû complètement ou presque complètement l'effet observé.

Action de l'asparagine du milieu

L'asparagine est la source azotée du milieu. En 1935², nous constatons les faits suivants, illustrés par les figures 6 et 7 déjà souvent reproduites. Une dose faible d'aneurine, 0,1 γ par exemple, pour 25 ccm de milieu exerce un effet différent selon la teneur en asparagine du milieu. En présence d'une dose faible de cette amide, 0,1 g% p. ex., agissant comme facteur limitant, le développement maximum sera atteint avec 0,1 γ de vitamine et le poids obtenu sera faible. Avec 0,5 g% d'asparagine et une durée de culture identique, le poids atteint avec 0,1 γ de vitamine sera plus élevé et cette dose ne représentera pas l'optimum qui se trouvera vers 0,2 γ. Avec 1,0 g% d'asparagine, le poids obtenu avec 0,1 γ d'aneurine sera encore plus élevé et l'optimum se trouvera vers 0,5 γ/25 ccm. Tout se passe comme si un synergisme d'action se manifestait entre l'asparagine et l'aneurine. Pratiquement, ce phénomène conduit à la constatation suivante: deux extraits, l'un pauvre, l'autre riche en asparagine, mais contenant la même dose faible d'aneurine, fourniront des poids de culture très différents. (Nous parlons d'asparagine, mais il peut s'agir de toute autre substance azotée ayant la même action.) Ces expériences semblent restreindre les possibilités d'utilisation du test. En fait l'inconvénient n'est pas si grave. La majorité des substances analysées n'atteste pas des taux excessifs en azote. D'autre part l'interprétation du graphique se fait dans la partie ascendante des courbes, correspondant à des volumes faibles de solution ajoutée. La quantité d'azote supplémentaire introduite n'est donc pas telle qu'elle faussera les données du test. Il n'y aura danger que si la substance analysée est, p. ex., une peptone ou un

extrait de viande riche en azote. Dans ce cas on sait que la méthode sera en défaut. Mais elle sera tout de même utilisable à l'aide du principe de compensation décrit plus loin.

Ces relations entre l'asparagine et l'aneurine ont été retrouvées par tous les biologistes qui se sont occupés

Asparagine 0,5%

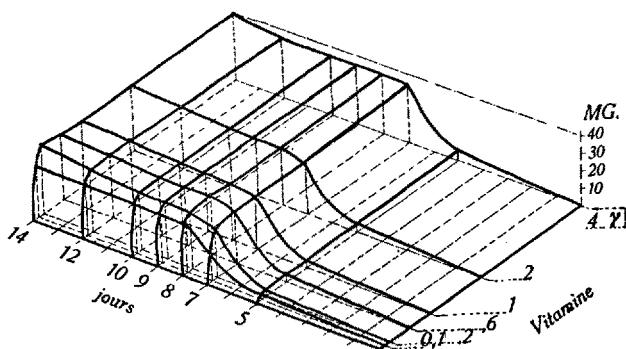


Fig. 6. Développement de *Phycomyces* en fonction du temps et de la concentration en aneurine, en présence de 0,5 g% d'asparagine. (D'après SCHOPFER, Protoplasma 1937.)

Asparagine 1%

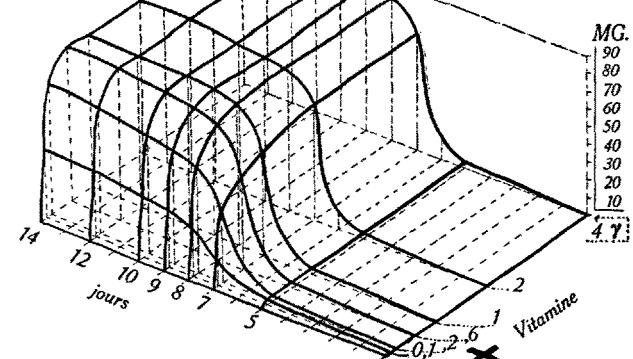


Fig. 7. Développement de *Phycomyces* en présence de 1 g% d'asparagine.

du test *Phycomyces*. MEIKLEJOHN¹ donne des courbes identiques aux nôtres. Effectuant des analyses d'aneurine dans le sang, il fait une compensation approximative en utilisant pour ses milieux de base la dose de 4% d'asparagine. Grâce à cette surcharge d'azote, l'effet de l'azote introduit avec la substance à analyser ne se marquera pas. SINCLAIR², dans une étude sur le taux en aneurine du sang, concluait à la présence dans le sang d'un «facteur adjuvant» contribuant à fournir des résultats trop élevés et nécessitant une correction. BANG³, dans un important travail

¹ J. MEIKLEJOHN, Biochem. J. 31, 1441 (1937).

² H. M. SINCLAIR, Biochem. J. 33, 2027 (1939).

³ H. O. BANG, Vitaminstudier ved hjælp af *Phycomyces*-metoden, København (1944).

sur le même sujet, montre que ce facteur adjuvant n'est probablement pas autre chose qu'un excès d'azote introduit par le sang. Il utilise également des milieux de base avec une forte dose d'asparagine, soit 4 g %. Les quelques modifications à la méthode se font toutes dans le cadre des faits que nous avons signalés dès 1935.

Action des catalyseurs minéraux (Spurenelemente)

Le milieu de base est pauvre en substances minérales. Il est à prévoir que l'introduction dans le milieu de catalyseurs minéraux déterminera peut-être une élévation du poids des récoltes. HURNI¹ vient de montrer que lorsque la source d'azote est représentée par du citrate d'ammonium, moins favorable que l'asparagine, l'adjonction du mélange salin de BERTHELOT détermine effectivement une augmentation durable du poids des récoltes de plus de +220% par rapport aux contrôles. Mais, lorsque la source d'azote est représentée par de l'asparagine, l'augmentation ne dépasse pas +5% avec les conditions culturales prescrites et des doses d'aneurine de 0,2 à 2 γ.

Le principe de la compensation

KOCHER² a proposé un test indirect, dit de compensation, permettant d'éviter certaines causes d'erreur. Le principe en est le suivant: dès 1931, nous avons montré qu'un traitement d'une solution contenant de l'aneurine par du noir animal a pour résultat une inactivation complète déterminée par l'adsorption de l'aneurine. Soit une solution d'un produit naturel complexe, riche en azote et contenant de l'aneurine. Traitée au noir animal, elle est débarrassée de sa vitamine B₁, mais contient encore les substances pouvant agir à côté de cette dernière. La solution traitée au noir animal sera ajoutée en volumes croissants aux flacons contenant le milieu de base+vitamine servant à l'établissement des courbes standards. Les conditions d'action de l'aneurine seront donc les mêmes dans les milieux standards+vitamine et dans les milieux contenant la substance à analyser. Des recherches comparatives nous ont montré que dans certains cas (substance riche en azote) le test indirect était notablement plus exact, dans certains cas inutile et dans d'autres défavorable.

Le principe de la compensation peut être utilisé pour l'hypoxanthine également (HURNI), la substance étant jointe au milieu standard.

L'organisme étudié ne réclame qu'une vitamine comme facteur essentiel. Sa physiologie culturelle

semble des plus simples. Ce bref exposé montre que le problème est beaucoup plus complexe qu'on le croyait tout d'abord. De nombreuses recherches ont été nécessaires. Elles n'ont pas permis de résoudre toutes les questions qui se posent. On peut cependant dire que tous les faits mis en évidence n'ont pu que confirmer la valeur du champignon comme test microbiologique pour la détermination de l'aneurine. Il est heureux que ce microorganisme si favorable à tous les égards et si facile à cultiver ait permis l'établissement du premier test microbiologique pratique et utilisable. Nous reconnaissions à ce test les avantages suivants: sensibilité plus élevée que celle du test animal, possibilité de travailler avec une petite quantité de substance, forte spécificité, possibilité de déterminer le taux vitaminique B₁ total, courte durée des expériences. Les avantages d'ordre technique sont si évidents qu'il est inutile d'insister.

Recherches effectuées avec le test *Phycomyces*

Etude de la méthode en général. FAGUET¹, traillant avec des adsorbats sur terre à foulon, trouve que le test donne des résultats comparables à ceux fournis par le pigeon. La méthode est plus précise. BONNER et ERIKSON (1938)² revisent la spécificité du test en concluant à son utilisation possible. THREN³ fait une étude critique de la méthode et confirme nos indications.

Déterminations dans les aliments et les produits naturels. VILLELA⁴, l'un des premiers à appliquer la méthode, décèle l'aneurine dans les feuilles de maté. MARCQ et MANIL⁵ font des déterminations comparées de la teneur en aneurine de levures sèches, extraites et non extraites avec le test *Phycomyces* et le test animal (poussin) et trouvent des concordances satisfaisantes. KOCHER⁶ fait une étude quantitative du taux en aneurine du miel et, à l'aide de la méthode indirecte, de compensation, mesure le taux en aneurine totale de quelques aliments. Nous-mêmes avons essayé la méthode avec de nombreux produits naturels, germe de blé p. ex. (SCHOPFER et JUNG)⁷.

Physiologie végétale. De nombreux problèmes ont été abordés qui n'auraient pas pu être étudiés sans le test microbiologique. Nous mettons en évidence la présence de l'aneurine dans les feuilles de 134 espèces

¹ M. FAGUET, C. r. Soc. Biol. Paris 126, 856 (1937).

² J. BONNER and J. ERIKSON, Amer. J. Bot. 25, 685 (1938).

³ R. THREN, Vitamine und Hormone 1, 100 (1941).

⁴ G. G. VILLELA, C. r. Soc. Biol. Paris 129, 987 (1938); O Hospital (Rio de Janeiro) 13, 43 (1938).

⁵ J. MARCQ et P. MANIL, Bull. Inst. Agronom. Gembloux 8, 172 (1939).

⁶ V. KOCHER, Beihefte z. Schweiz. Bienenztg. 1, 157 (1942).

⁷ W. H. SCHOPFER et A. JUNG, C. R. Soc. Biol. Paris 122, 249 (1936).

de plantes (1936)¹. BONNER et GREENE² constatent le taux très élevé en aneurine d'*Azotobacter* et trouvent la vitamine dans des engrains naturels. Ce sont surtout les problèmes relatifs au métabolisme et à la biosynthèse de l'aneurine chez les plantes qui ont bénéficié des avantages du test. NEIPP (1943)³ étudie l'action de l'aneurine sur la croissance de la valériane officinale et détermine à l'aide du test les taux en aneurine des racines de plantes traitées.

BONNER et GREENE (1938)² ainsi que RYTZ jr. (1939)⁴ montrent que l'aneurine se forme surtout dans les tissus jeunes des plantes étudiées. RYTZ jr.⁴ et surtout HURNI (1944)⁵, de même que BURKHOLDER et McVEIGH⁶ font une étude détaillée de la biosynthèse de la vitamine B₁ au cours de tout le développement. Ce sont effectivement les parties physiologiquement jeunes de la plante (*Pisum*, Hybrides de Maïs, *Melandrium*) qui sont les plus riches en aneurine. BURKHOLDER et McVEIGH ainsi que H. HURNI montrent l'action des engrains sur la marche de la biosynthèse. BONNER (1942)⁷ étudie le transport de l'aneurine et sa migration chez la tomate. Dans ce domaine les études n'en sont qu'à leur début.

Physiologie animale. Avec A. JUNG⁸ nous montrons que les organes de rats en avitaminose B₁ sont effectivement plus pauvres en aneurine que ceux de rats normaux. L'expérience montre que la méthode est utilisable pour la détermination de l'aneurine dans le sang et le lait (SCHOPFER)⁹. Pour le sang surtout, de nombreux travaux ont été effectués. MEIKLEJOHN¹⁰ est le premier à effectuer des déterminations et livre les premiers chiffres établis grâce au test microbiologique. SINCLAIR¹¹, ROWLAND et WILKINSON¹² l'utilisent également. Pour le liquide céphalo-spinal, SINCLAIR¹³ estime cependant que la méthode n'est pas utilisable en clinique.

MORELL (1938)¹⁴, GUHR (1939)¹⁵, GOODHART et SINCLAIR (1940)¹⁶, LEHMANN et NIELSEN (1941)¹⁷

SÄKER (1940)¹, PANNEKOEK-WESTENBURG (1940)², ODIN et LEHMANN (1941)³ ont tous, dans des circonstances diverses, appliqué la méthode pour l'étude du sang. Il faut citer en terminant le travail magistral de H. O. BANG (1944)⁴ qui fait une étude détaillée du sang de 50 individus normaux et de 640 patients divers. Il est impossible d'entrer ici dans le détail de ces travaux. Citons simplement quelques chiffres tirés d'un tableau de BANG et se rapportant au sang normal:

Tableau 5

MEIKLEJOHN (1937)	7–12,5 γ %	3 individus
MORELL (1938)	6,5–16,5 γ %	
SINCLAIR (1939)	5,5–10,5 γ %	73 individus
LEHMANN et NIELSEN (1939)	9 γ % (moy.)	66 individus
GUHR (1939)	8–10 γ %	10 individus
SÄKER (1940)	6–16 γ %	
GOODHART et SINCLAIR (1940)	0–13 γ % a)	80 individus
	1,5–13 γ % b)	

a) Méthode par activation de la cocarboxylase
b) Test *Phycomyces*.

Mentionnons encore l'intéressante application de la méthode qu'ont faite v. MURALT et ZEMP (1943)⁵ et Wyss (1945)⁶ en déterminant le taux en aneurine de nerfs excités ou non.

Nous avions montré la possibilité d'employer le test pour le lait. W. RITTER⁷ fait une étude détaillée à ce sujet. Pour le lait complet il donne un taux de 48,5 γ %, pour le beurre de 5,0 à 6,2 γ % et pour un échantillon de fromage (Emmental) 35 γ %.

Ce choix de travaux indique que le test microbiologique constitue non seulement un instrument précieux pour la chimie alimentaire et la physiologie animale et humaine, mais qu'il permet au physiologiste des plantes d'aborder le problème fondamental du métabolisme et de la biosynthèse de l'aneurine.

Summary

The growth factors for microorganisms are nothing else than the vitamins known in animal physiology. Some microorganisms, like animals, have lost the possibility of synthetising these factors, which must be added to the culture medium. The action of the vitamin is quantitative and specific. These properties enable the auxo-heterotrophic microorganism, having lost the possibility of synthesis for a determined vitamin, to be used for a quantitative determination of this factor. The *Phycomyces* test for thiamine (vitamine B₁) and its different practical applications are discussed.

- ¹ W. H. SCHOPFER, Arch. f. Mikrobiol. 7, 156 (1936).
- ² J. BONNER and J. GREENE, Bot. Gaz. 100, 226 (1938).
- ³ L. NEIPP, Vol. centenaire Soc. suisse Pharmacie, p. 510 (1943).
- ⁴ W. RYTZ jr., Thèse Berne, Bull. Soc. bot. suisse 49, 339 (1939).
- ⁵ H. HURNI, Thèse Berne, Z. f. Vitaminforschung 15, 198 (1944).
- ⁶ P. R. BURKHOLDER and I. McVEIGH, Amer. J. Bot. 27, 853 (1940).
- ⁷ J. BONNER, Amer. J. Bot. 29, 136 (1942).
- ⁸ W. H. SCHOPFER et A. JUNG, Z. f. Vitaminforschung 7, 143 (1938).
- ⁹ W. H. SCHOPFER, Arch. f. Mikrobiol. 8, 231 (1937).
- ¹⁰ A. P. MEIKLEJOHN, Biochem. J. 31, 1441 (1937).
- ¹¹ H. M. SINCLAIR, Biochem. J. 32, 2185 (1938); 33, 2127 (1939).
- ¹² E. N. ROWLAND and J. F. WILKINSON, Brit. Med. J. 2, 878 (1938).
- ¹³ H. M. SINCLAIR, Biochem. J. 33, 1816 (1939).
- ¹⁴ T. MORELL, Deutsche med. Wochenschr. 64, 1722 (1938).
- ¹⁵ G. GUHR, Klin. Wochenschr. 18, 1028 (1939).
- ¹⁶ R. GOODHART and H. M. SINCLAIR, J. Biol. Chem. 132, 11 (1940).
- ¹⁷ J. LEHMANN und H. E. NIELSEN, Acta med. Scandinav. supp. 123, 374 (1941).
- ¹ G. SÄKER, Klin. Wochenschr. 19, 99 (1940).
- ² S. J. E. PANNEKOEK-WESTENBURG and A. G. VAN VEEN (Ref.), J. A. M. A. 115, 1494 (1940) (in BANG 1944).
- ³ M. ODIN und J. LEHMANN, Acta med. Scandinav., Supp., 123 390 (1941).
- ⁴ H. O. BANG, B₁-Vitaminstudier ved hjælp af *Phycomyces*-metoden, København (1944).
- ⁵ A. von MURALT und J. ZEMP, Pflügers Arch. 246, 746 (1943).
- ⁶ A. und F. WYSS, Exper. I, 160 (1945).
- ⁷ W. RITTER, Schweiz. Milchzeitung, Nr. 16 und 17 (1944).