

118. La biotine, l'aneurine et le méso-inositol, facteurs de croissance
pour *Eremothecium Ashbyii* Guillermond.

La biosynthèse de la riboflavine

par W. H. Schopfer.

(12 V 44)

1. Introduction.

Eremothecium Ashbyii est un champignon Ascomycète, parasite des capsules du cotonnier, décrit pour la première fois par Guillermond en 1935¹⁾. Il présente un grand intérêt pour le biologiste par le fait qu'il produit une quantité anormalement élevée de flavine. Cette dernière a été l'objet d'études de Guillermond et de ses élèves²⁾. Mlle A. Raffy³⁾ met en évidence les propriétés vitaminiques de cette flavine qui se révèle être de la riboflavine, vitamine de croissance du groupe B₂. Le même auteur⁴⁾ fait une étude spectrographique de ce pigment. Mirimanoff et Mlle A. Raffy⁵⁾ l'obtiennent à l'état cristallisé. A l'aide des méthodes les plus diverses: cytologique, microchimique, spectrographique, physiologique, le pigment jaune produit par le champignon, fortement fluorescent en lumière de Wood a pu être définitivement identifié avec la riboflavine. La combinaison de ces méthodes, qui donne d'heureux résultats, avait déjà été effectuée pour l'identification du carotène de *Phycomyces blakesleeanus* (Schopfer et Jung 1935).

Un aspect du problème a cependant été négligé. En effet, la physiologie culturale et le métabolisme de ce champignon sont pour ainsi dire inconnus. Seule une étude de ce genre permettrait de préciser les conditions de formation du pigment flavinique. Par le fait que la riboflavine s'accumule en quantités énormes dans le milieu et peut y être directement décelée, nous avons là une occasion unique d'étudier la biosynthèse d'une vitamine dont on sait qu'elle est de première importance pour les microorganismes. Jusqu'à maintenant, cette vitamine a été avant tout étudiée au titre de facteur de croissance exogène requis par quelques microorganismes auxo-hétérotrophes (B. lactiques p. ex. *Orla-Jensen*).

¹⁾ A. Guillermond, C. r. **200**, 1556 (1935).

²⁾ A. Guillermond, Rev. Mycologie **1**, 115 (1936); A. Guillermond, M. Fontaine et Mlle A. Raffy, C. r. **201**, 1077 (1935).

³⁾ Mlle A. Raffy, C. r. Soc. Biol. **126**, 875 (1937).

⁴⁾ Mlle A. Raffy, C. r. Soc. Biol. **128**, 392 (1938).

⁵⁾ A. Mirimanoff et Mlle A. Raffy, C. r. **206**, 1507 (1938); Mlle A. Raffy et A. Mirimanoff, Bl. Soc. chim. biol. Paris, **20**, 1166 (1938).

Une étude du genre de celle que nous nous proposons sous-entend que l'on sache cultiver le champignon sur un milieu synthétique. Jusqu'à maintenant, cette culture n'a été effectuée que sur quelques milieux naturels types: moût de bière, gélose de *Sabouraud*, bouillon de pomme de terre et de carotte, tranche de pomme de terre et de carotte. Ces milieux font la joie du mycologue, mais désespèrent le physiologiste qui ne sait exactement ce qu'il introduit dans son milieu.

Nous étudierons tout d'abord la croissance et la production de flavine sur quelques milieux naturels, puis tenterons les mêmes recherches sur milieux synthétiques.

Toutes nos cultures se font à l'obscurité complète, à la température constante de 28°. Le milieu de base est constitué par du glucose 1%, du glycocolle ou de l'asparagine 0,1%, du sulfate de magnésium 0,05% et du phosphate acide de potassium 0,15%. Les différents extraits sont ajoutés à ce milieu et stérilisés avec lui, à 120° pendant 15 minutes. La souche utilisée provient de Baarn. Le thalle et le milieu sont fortement colorés. La suspension destinée à l'inoculation contient, finement dispersés, des fragments de hyphes et des spores. L'inoculation se fait avec un petit nombre de gouttes (2—5), toutes les fioles d'une même expérience étant ensemencées avec le même nombre de gouttes. Nous vérifions à la lumière de *Wood* si la suspension d'inoculation n'introduit pas dans le milieu une quantité de flavine telle que les résultats des analyses ultérieures soient faussés. Ce n'est jamais le cas. Il faut cependant noter que chaque milieu reçoit de ce fait une très faible quantité de flavine, inférieure à 0,3 γ pour 25 cm³ de liquide nutritif. Toutes les expériences se font dans des erlenmeyers en verre d'Iéna de 150 cm³, contenant 25 cm³ de milieu.

Les analyses de flavine se font par comparaison avec des solutions standards exactement étalonnées, à la lumière ordinaire ou à la lumière de *Wood*, dans des conditions telles que les comparaisons soient possibles et les résultats valables. En lumière de *Wood*, il est possible de déceler des quantités de flavine inférieures à 0,5 γ pour 25 cm³ de milieu. Nous ne sommes pas certains que la riboflavine seule soit produite, quoique cette dernière constitue certainement la majeure partie des pigments formés. Par convention, nous exprimons nos résultats en riboflavine (6,7-diméthyl-9-(d-1'-ribityl)-iso-alloxazine, C₁₇H₂₀O₆N₄), par comparaison avec des étalons de riboflavine pure.

2. Cultures sur milieux naturels et semi-synthétiques¹⁾.

Sur milieu agarisé avec extrait d'avoine, de levure ou de carotte, le développement est bon. La production de flavine est très forte sur avoine, forte sur levure, plus faible sur carotte.

Sur milieu liquide, les résultats sont les suivants, après 7 jours de culture.

On voit donc que différents extraits animaux et végétaux permettent la croissance et la flavinogenèse. Le thalle reste submergé et est constitué par des flocons globuleux en nombre variable, se laissant très facilement séparer du milieu par filtration. On constate que sur le milieu synthétique seul, sans extrait, aucun développement ne se produit. Celui-ci, de même que la flavinogenèse, sont déclenchés par les

¹⁾ Nous appelons semi-synthétique le milieu contenant une source azotée et carbonée connue, et, en plus, un extrait naturel ou un concentrat agissant selon toute probabilité comme source de facteurs de croissance.

substances introduites par les extraits. Il y a donc beaucoup de chances pour que cet organisme soit auxo-hétérotrophe. Si nous voulons parvenir à cultiver notre organisme sur milieu synthétique, il est donc nécessaire d'y introduire des facteurs de croissance vitaminiques. Or, *Eremothecium Ashbyii* est très voisin d'*Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Guil. (*Nematospora gossypii* Ashby et Nowell), dont il diffère par quelques caractères culturaux, morphologiques (forme des spores),

Tableau 1.

Milieu de base +	Croissance	Flavine
Extrait de germe de blé conc.	+++	+++
Extrait d'avoine	++	++
Extrait de carotte	++	+
Extrait de pomme de terre	+++	+++
Extrait de betterave	++	++
Extrait de foie	++	+ (+)
Extrait de thalle de <i>Phycomyces</i>	+	+ (+)
Extrait de thalle de <i>Rhizopus suinus</i>	+ (+)	++
Milieu de culture de <i>Phycomyces</i> , <i>Rhizopus suinus</i> , <i>Ceratostomella ulmi</i>	0+	0+
Urine stérilisée par filtration	++	++
Urine stérilisée à chaud	+	(+)
Contrôle (sans extrait)	0	0

L'intensité de la croissance et de la flavinogenèse est indiquée par les signes suivants: (+) très faibles; +, + (+) faible et moyenne; ++ moyenne; +++ forte; ++++ très forte.

physiologiques et surtout par le fait qu'*Ashbya* ne forme qu'une faible quantité de flavine. Ce dernier champignon a été étudié par Kögl et Fries¹), et Fries²). Pour sa culture sur un milieu synthétique déterminé, il requiert la biotine (vitamine H), l'aneurine (vitamine B₁) et le méso-inositol. Or, malgré la présence en doses certainement supra-optimales de ces trois vitamines, il n'a pas été possible de cultiver notre champignon sur milieu synthétique. *Eremothecium Ashbyii* doit être auxo-hétérotrophe d'une manière différente d'*Ashbya gossypii*. Son auxo-hétérotrophie doit probablement être plus marquée, ce que nous étudierons par la suite.

Une expérience avec adjonction d'un extrait de levure (Faex sicc.) à 3 % au milieu à base de glucose et de glycocolle confirmera les essais précédents. Cultures de 7 jours:

¹⁾ F. Kögl und N. Fries, Z. physiol. Ch. **249**, 93 (1937).

²⁾ N. Fries, Symbolae Botan. Upsalienses III, 2 (1938).

Tableau 2.

Extrait de levure	0	0,1	0,5	1	2	4 cm ³
Poids sec mgr.	0	0,4	2,4	3,6	4,2	7
Flavine pour 25 cm ³ milieu, γ	0	0	50	175	400	750

L'action de l'extrait de levure est quantitative, tant en ce qui concerne le poids sec de matière vivante formée qu'en ce qui concerne la flavinogenèse.

Action de diverses sources carbonées et azotées (en présence d'extrait de levure).

Six glucides sont étudiés en présence d'asparagine et de glycocolle et de 0,5 et 4 cm³ d'extrait de levure pour 25 cm³ de milieu.

Tableau 3.

Extrait de levure, cm ³			0	0,5	4
Glucose après 12 j.	A	poids	0	—	10,4 mgr.
	A	flavine	0	100	800 γ
	G	poids	0	1	8,6 mgr.
	G	flavine	0	25	600 γ
Maltose de <i>Kahlbaum</i> après 12 j.	A	poids	4,2	3,4	18 mgr.
	A	flavine	77	300	600 γ
	G	poids	2,1	3,8	18,4 mgr.
	G	flavine	5	25	400 γ
Lactose après 9 j.	A	poids	0	—	5,4 mgr.
	A	flavine	0	—	175 γ
	G	poids	0	0,6	3,8 mgr.
	G	flavine	0	10	175 γ
Saccharose après 9 j.	A	poids	0	1,2	13,6 mgr.
	A	flavine	0	350	750 γ
	G	poids	0	—	13,8 mgr.
	G	flavine	0	—	350 γ
Galactose après 9 j.	A	poids	0	0,8	4,2 mgr.
	A	flavine	0	125	200 γ
	G	poids	0	0,2	1,8 mgr.
	G	flavine	0	50	165 γ
Lévulose après 9 j.	A	poids	0	2,6	12,4 mgr.
	A	flavine	0	400	700 γ
	G	poids	0	1,2	8,2 mgr.
	G	flavine	0	50	375 γ

A = asparagine, G = glycocolle à la dose de 1 gr.^{0/oo}.

Une expérience de contrôle, effectuée avec chaque sucre, en présence d'asparagine ou de glucose et des vitamines (aneurine, biotine et méso-inositol), atteste à nouveau qu'aucun développement ne se produit.

On constate que le maltose, le saccharose, le glucose et le lévulose sont particulièrement favorables, avec 4 cm³ d'extrait de levure, tandis que le lactose et le galactose le sont moins. En présence d'asparagine, et sauf pour le glucose et le maltose où il y a égalité, les poids sont plus élevés qu'en présence de glycocolle. Les glucides peu favorables au développement, le sont également moins pour la flavinogenèse. Les taux de flavine sont plus élevés avec asparagine qu'avec glycocolle.

On relève avec surprise que le maltose de *Kahlbaum* permet un développement et une flavinogenèse nettes *sans adjonction d'extrait de levure*. Ce sucre que nous avons déjà étudié en 1931 est riche en impuretés vitaminiques. Il contient non seulement de l'aneurine (test *Phycomyces*), mais aussi 1,45 mg de biotine par gr. (test *Saccharomyces cerevisiae*) et probablement des traces d'adermine. On peut provisoirement admettre que les impuretés vitaminiques du maltose K., jointes aux substances inconnues apportées par ce sucre, peut-être des catalyseurs minéraux, permettent un début de développement et de flavinogenèse. L'hypothèse que notre champignon, en présence de maltose acquiert une auxo-autotrophie partielle a été examinée et reste posée, mais n'est pas démontrée pour l'instant.

Ces expériences n'ont naturellement — à part celle relative au maltose sans extrait de levure — qu'une valeur d'orientation. L'extrait de levure apporte non seulement des facteurs de croissance, mais des matériaux nutritifs capables de modifier quelque peu les résultats. Nous sommes obligés de nous contenter de ces résultats pour l'instant par le fait que nous ne savons pas cultiver le champignon sur un milieu rigoureusement synthétique.

Influence de la concentration en glucide.

Glucose, en présence d'asparagine et de 4 cm³ d'extrait de levure. Cultures de 8 jours.

Tableau 4.

Glucose	1%	3%	6%	12%	18%	24%
Flavine p. 25 cm ³ , γ . .	450	540	450	414	319	178

L'optimum se trouve vers 3% de glucose, concentration que nous utilisons habituellement.

Action de la concentration en ions d'hydrogène.

Glucose, en présence d'asparagine et de 4 cm³ d'extrait de levure. Solutions tampons de *McIlwain*, acide citrique et phosphate disodique, diluées deux fois: 1 partie de solutions tampons et 1 partie de milieu concentré deux fois. De pH 2,2 à pH 3 aucun développement. A partir de pH 3,6, croissance et flavinogenèse. Au 16ème jour, le pH optimal est de 5 pour la biosynthèse de la flavine.

Tableau 5.

P_H	3,6	5,0	8,0
Poids mgr. . . .	5,2	5,4	2,9
Flavine, γ	125	600	313

On constate que sans modification notable du poids de matière sèche, en passant de P_H 3,6 à 5,0 la flavinogenèse est presque quintuplée. *Il doit donc exister des conditions spécifiques de flavinogenèse, indépendantes du développement.*

Action des peptones.

Les diverses peptones que nous avions utilisées dans nos recherches sur *Trichophyton album*¹⁾, comme source d'azote et de vitamines sont employées ici aux doses de 1 gr.^{0/00}, ajoutées au milieu à base de glucose et de sels minéraux. Cultures de 12 jours.

Tableau 6.

Peptone	Poids culture mgr.	Flavine $\gamma/25 \text{ cm}^3$	Biotine $\gamma/\text{gr. peptone}$	Rapport poids/flavine
1. Bactopeptone <i>Difco</i> .	1,9	125	0,38	15,2
2. Bactoprotone <i>Difco</i> .	0	0	0,02	—
3. Bactotryptone <i>Difco</i> .	5,5	600	0,02—0,03 (0,025)	9,2
4. Néopeptone <i>Difco</i> . .	8,9	325	0,455	27,4
5. Protéose-peptone <i>Difco</i>	7,4	175	0,440	42,3
6. Peptone sèche <i>Chapoteaut</i>	10,9	450	0,05—0,1 (0,075)	24,2
7. Peptone granulée . .	5,4	300	0,2—0,4 (0,3)	18,0
8. Peptone exemplaire d'indol <i>Poulenc</i> . . .	6,0	275	0,2—0,4 (0,3)	21,8
9. Peptone pepsique <i>Poulenc</i>	5,1	125	0,05—0,1 (0,075)	40,8
10. Peptone de soie . . .	0,3	375	0,1—0,2 (0,15)	0,8
11. Peptone spongieuse <i>Poulenc</i>	traces	0	moins de 0,02	—
12. Peptone bactériologique <i>Byla</i>	2,7	750	0,1—0,2 (0,15)	3,6
13. Peptone <i>BDH</i>	0,4	50	0,02—0,05 (0,035)	8,0
14. Peptone <i>sine sale Merck</i>	0	0	moins de 0,02	—
15. Peptone <i>Witte</i>	1,6	700	0,02—0,05 (0,035)	2,3
16. Peptone <i>Roche</i>	0,6	75	0,05—0,10 (0,075)	8,0
17. Peptone <i>Siegfried</i> . . .	2,2	650	0,05—0,10 (0,075)	3,4
Contrôle	0	0	—	—

On constate tout d'abord le contraste marqué entre l'intense formation de flavine et les poids relativement faibles de matière sèche produite. Le poids le plus élevé est fourni par la peptone sèche de *Chapoteaut*, soit 10,9 mgr. Une série parallèle d'expériences a été

¹⁾ W. H. Schopfer und S. Blumer, Ber. schweiz. bot. Ges. 53, 409 (1943).

faite en ajoutant au milieu, à part la peptone, 1 gr.^{0/00} de glycocolle. Les résultats sont très peu différents en ce qui concerne le poids des cultures. Une peptone qui, employée seule comme source d'azote, agit faiblement n'a pas son action augmentée par la présence du glycocolle. L'azote de ce dernier n'exerce pas un effet marqué, en présence des peptones utilisées. Pour la peptone *Roche* seule, le poids des cultures est doublé par l'adjonction de l'acide aminé. Par contre la flavinogenèse est modifiée, notamment plus faible, sauf pour les peptones pepsique, bactériologique *Byla* et *Roche* où elle est un peu plus forte. Pour la peptone de soie et la peptone *BDH*, il n'y a pas de changements.

On relève les grandes variations qui se manifestent dans l'action des différentes peptones, tant au sujet des poids secs des cultures que de la flavinogenèse. Les peptones bactériologiques *Byla*, *Witte*, *Siegfried* ainsi que la bactotryptone *Difco* sont les plus actives pour la flavinogenèse. La *bactoprotone Difco*, les peptones spongieuze, *Merck* sine sale, sont sans aucune action sur la croissance qui, en 12 jours, ne se déclanche pas. Il est hors de doute que c'est tout d'abord comme source d'azote que les peptones agissent sur la croissance. Il est intéressant de relever que la bactoprotone est, parmi les peptones *Difco*, celle qui est la plus pauvre en acides aminés libres et la plus riche en protéoses (*Difco Manual*). C'est très probablement ce caractère qui la rend inutilisable pour *Eremothecium*.

Les peptones utilisées sont également source de facteurs de croissance vitaminiques (voir tableau 6). En déterminant leur teneur en biotine, à propos de recherches sur *Trichophyton album*¹⁾, nous avons montré que leur taux en vitamine H expliquait dans une certaine mesure leur action sur ce champignon, si fortement auxo-hétérotrophe. La question se pose ici de savoir si le même phénomène peut être observé pour *Eremothecium*. Nous déterminerons plus loin les doses actives de biotine pour notre champignon. Nous constaterons qu'avec $1 \times 10^{-6} \gamma$ un début de développement se produit et que la dose de $1 \times 10^{-3} \gamma$ est optimale. Or, si nous considérons au tableau 6, les doses de biotine les plus faibles qui aient été observées, 0,02 γ par gr., nous constatons qu'en introduisant 1 gr. de peptone par litre, nous avons pour 25 cm³ de milieu $5 \times 10^{-4} \gamma$ de vitamine. Si la biotine contenue dans les peptones est utilisable, il n'est donc pas impossible que cette vitamine détermine en partie l'activité de ces dernières.

Nous avons, dans l'expérience transcrise au tableau 6, 3 facteurs variables: le poids sec des cultures, la teneur en flavine des milieux, la teneur en biotine des peptones.

Relations entre la production de matière sèche et la teneur en biotine des peptones.

Les deux peptones dont les teneurs en biotine sont les plus élevées (n° 4 et 5) fournissent des poids de matière sèche très élevés également. Les peptones 2, 11, 13, 14, dont les teneurs en vitamine H sont très faibles donnent les poids de matière sèche les plus bas (n° 13) ou ne permettent aucun développement (n° 2, 11, 14). Mais cette régularité est troublée par la peptone sèche de *Chapoteau* (n° 6) dont la teneur en biotine n'est pas très élevée et qui fournit le poids sec de culture le plus fort. D'autre part, la peptone de soie dont le taux en biotine est appréciable ne permet qu'une croissance insignifiante. Il n'y a donc pas corrélation absolue entre les deux facteurs. La biotine est certainement un facteur essentiel pour le développement d'*Eremothecium* se développant en présence de peptone. Mais l'action de ces dernières dépend également de sa teneur en azote assimilable, de la nature et de la quantité des acides aminés qu'elles contiennent, éventuellement de l'existence de substances inhibitrices qui peuvent freiner le développement malgré la présence d'une quantité appréciable de vitamine H.

Relations entre la flavinogenèse et la teneur en biotine des peptones.

Là encore un certain parallélisme se manifeste qui n'est cependant pas constant. Les peptones 2, 11, 13, 14 qui ont des teneurs en biotine faibles ne permettent que des flavinogenèses faibles aussi: avec les n° 2, 11 et 13 il n'y a d'ailleurs aucune croissance.

¹⁾ W. H. Schopfer und S. Blumer, loc. cit.

La peptone n° 6, avec peu de biotine, livre une quantité appréciable de flavine. Surtout, les peptones 10, 12, 15 et 17, les trois dernières fournissant les taux de flavine les plus élevés, ont des teneurs en biotine relativement faibles. La corrélation biotine-flavine est encore moins satisfaisante que la corrélation biotine-poids sec des cultures. Il doit donc certainement exister des conditions spécifiques de la flavinogenèse telles que malgré le poids faible des cultures, allant de pair avec une teneur peu élevée des peptones en biotine, la flavine est produite en grande quantité. Dans ce dernier cas, il n'existe aucune corrélation entre la production de matière sèche et la flavinogenèse.

3. Détermination de la constellation de facteurs de croissance pour *Eremothecium Ashbyii*.

Nous nous trouvons donc en face du paradoxe suivant: *Eremothecium Ashbyii* est très voisin d'*Ashbyia gossypii* qui réclame comme facteurs de croissance vitaminiques l'aneurine, la biotine et l'inositol, mais ces vitamines n'agissent pas sur le premier champignon. Les peptones qui sont riches en aneurine et en biotine agissent sur *Eremothecium* et tout se passe comme si leur teneur en aneurine et en biotine déterminait partiellement leur activité.

Pour résoudre ce problème, nous avons imaginé la méthode suivante. Une peptone particulièrement favorable est privée de ses facteurs vitaminiques, aneurine et biotine, par un traitement à la norite qui adsorbe ces dernières. Le liquide clair obtenu (filtrat), qui, employé seul est inactif, est ajouté au milieu synthétique avec la biotine et l'aneurine.

L'adsorption se fait en deux temps: un premier traitement avec deux fois 25 gr. de norite détermine une adsorption incomplète et le filtrat est encore légèrement coloré. Une deuxième adsorption avec 20 gr. de norite supplémentaire fournit un filtrat décoloré complètement. Les solutions de peptone sont à 6%: 1 cm³ = 60 mgr., 0,5 cm³ = 30 mgr., 0,1 cm³ = 6 mgr. de substance. Ces chiffres ne correspondent plus à la réalité puisque le traitement à la norite a éliminé certaines substances.

Les solutions de peptones sont analysées du point de vue de leur teneur en biotine à l'aide du test *Saccharomyces* selon *Snell, Eakin et Williams*.

Tableau 7.

Peptone	mg biotine par gr.		
	non traitée	1er traitement	2ème traitement
Bactotryptone (n° 3) . .	233	76,3	0
Peptone sèche (n° 6) . .	88,8	6,2	0
Peptone granulée (7) . .	206,7	—	0
Peptone bactériol. (12) .	145	—	0
Peptone Witte (15) . .	45,7	—	0

Les taux indiqués pour les peptones sont en accord avec les taux moyens établis lors des recherches sur *Trichophyton album*. Les taux en biotine après le premier traitement n'ont été établis qu'avec les deux premières peptones: ils attestent une diminution notable, surtout pour la peptone n° 6. Après le 2ème traitement, il ne reste plus trace de biotine décelable par le test *Saccharomyces*.

Tableau 8.

Peptone mgr. (filtrat)	Sans vitamines						Avec vitamines					
	6		30		60		6		30		60	
	mgr.	γ	mgr.	γ	mgr.	γ	mgr.	γ	mgr.	γ	mgr.	γ
Btr	a	1,4	150	8,8	163	—	—	4,6	25	30	525	57,8
	b	2,6	75	7	150	9,2	250	4,4	50	24,6	350	40
	c	0	0	0	0	0	0	1,4	7,5	9,8	50	19,8
PCh	a	3	100	7,2	100	10,6	100	10,4	113	23,2	250	31,4
	b	0,8	2,5	4,2	50	5,6	63	5,6	43	12,4	100	13,2
	c	0	0	0	0	0	tr	1,4	10	6,4	43	7
PGr	a	1,6	113	7,6	100	9,2	100	4,2	88	16,4	200	28,6
	b	1,2	25	3,6	75	5,6	88	3,8	43	—	—	16,4
	c	0	0	0	tr	0	0	0,8	15	2,6	75	6,8
PBy	a	3,4	250	6,2	375	—	—	7,6	100	22,4	500	35,8
	b	0,1	tr	1,6	10	3,4	38	2,6	50	5,2	150	14,2
	c	0,1	tr	0	0	0,1	tr	10,2	25	20	88	—
PWi	a	1,4	38	2,6	450	3,8	500	5,8	75	27,2	250	57,2
	b	0,1	2,5	2,4	150	3,8	175	3,2	75	17,8	150	23
	c	0	0	0,1	5	0,1	0	0,8	25	7,8	100	9,4

Btr: Bactotryptone *Difco*

PBy: Peptone bactériologique *Byla*

PCh: Peptone sèche *Chapoteaut*

PWi: Peptone *Witte*

PGr: Peptone granulée

a: Peptone normale, non traitée.

b: Filtrat de la peptone après une première adsorption par la norite.

c: Filtrat de la peptone après une deuxième adsorption par la norite.

Pour chaque dose de peptone, de 6 à 60 mgr. pour 25 cm³ de milieu, deux colonnes: dans la première le poids sec de la culture en mgr., dans la seconde, la teneur en flavine en γ pour 25 cm³ de milieu. tr = traces: dose de flavine inférieure à 0,30 γ .

La fig. 1 indique l'intensité de la flavinogénèse en présence de peptone *Siegfried* normale (a), traitée une fois (b) et deux fois (c), par la norite.

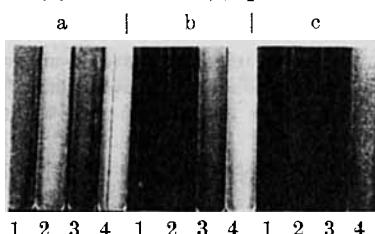


Fig. 1.

Production de flavine en présence de peptone *Siegfried*.

a: Peptone non traitée.

b: Filtrat de peptone après la première adsorption à la norite.

c: Filtrat de peptone après la deuxième adsorption à la norite.

1: 6 mgr. de peptone } sans vitamines.

2: 60 mgr. de peptone }

3: 6 mgr. de peptone } avec aneuriné, inositol et biotine.

4: 60 mgr. de peptone }

Les milieux de culture ont été répartis dans des tubes égaux. Lumière de *Wood*, exposition 2 minutes, filtre objectif.

On remarquera que les mêmes peptones ne fournissent pas toujours des taux de flavine identiques. La cause de ces différences réside dans le fait que les souches d'inoculation, au cours de plusieurs repiquages, ne conservent pas le même pouvoir flavinogène. Ces variations spontanées ou progressives seront étudiées dans un autre mémoire. Pour l'instant, les comparaisons ne peuvent être effectuées qu'entre expériences inoculées en même temps à partir de la même souche.

L'expérience relatée au tableau 8 est effectuée avec 5 peptones, non traitées et après deux adsorptions, en doses croissantes, avec et sans vitamines. Les vitamines sont en doses supra-optimale : aneurine 10 γ, biotine 0,06 γ, méso-inositol 1 mgr. Elles sont stérilisées à part et ajoutées à froid, après la stérilisation des milieux, de même que les peptones.

L'examen du tableau 8 dispense de tout commentaire. Nous constatons que : 1) les peptones agissent quantitativement, 2) avec adjonction de vitamines les poids de matière sèche produite sont plus élevés que sans vitamine, 3) l'action des peptones sur la biosynthèse des flavines est quantitative, 4) l'adjonction de vitamine augmente la flavinogenèse, sauf pour la peptone *Witte* où elle est diminuée, 5) une première adsorption diminue la production de matière sèche ainsi que la flavinogenèse, en présence ou non de vitamines, 6) une deuxième adsorption — complète — supprime développement et flavinogenèse en l'absence de vitamines, alors qu'en présence de vitamines, un développement et une flavinogenèse appréciables se manifestent. Alors que les vitamines seules et la peptone traitée seule sont sans action, les deux ensemble déterminent le développement. Tout se passe comme si l'aneurine, la biotine et le méso-inositol étaient les facteurs de croissance nécessaires, mais en présence d'une ou plusieurs inconnues apportées par les peptones traitées. Entre les deux groupes, vitamines et peptone traitée, un synergisme se manifeste.

On ne peut encore considérer le milieu créé ainsi comme strictement synthétique, par le fait que nous ignorons la nature des substances indispensables apportées par la peptone traitée (filtrat). Il représente cependant un notable progrès, comparé au milieu naturel. Sa constitution provisoire sera donc la suivante :

Glucose puriss. 3 gr., glycocolle 0,1 gr., sulfate de magnésium 0,05 gr., phosphate acide de potassium 0,15 gr., peptone *Witte* traitée à la norite (filtrat) inactif sur *Saccharomyces cerevisiae* 4 cm³, aneurine 40 γ, biotine 0,25 γ, méso-inositol 4 mgr. pour 100 cm³ d'eau distillée.

Il est maintenant possible de déterminer exactement la part qui revient à chaque facteur vitaminique.

L'expérience suivante se fait en présence de glucose et de glycocolle et 0,5 cm³ de bactotryptone traitée. Age des cultures 25 jours. Chaque chiffre est une moyenne de 10 à 12 cultures (tableau 9).

Les teneurs en flavine sont plus faibles que celles fournies précédemment par la bactotryptone. Les taux ont diminué par suite d'un séjour prolongé à 28°.

On constate donc que l'auxo-hétérotrophie d'*Eremothecium* est comparable à celle d'*Ashbya gossypii*: la biotine est facteur essentiel puisqu'à elle seule elle détermine un développement appréciable. L'aneurine et l'inositol qui augmentent l'effet de la biotine sont des

facteurs complémentaires. Le facteur essentiel et les facteurs complémentaires ne le sont qu'en présence des substances introduites avec les peptones traitées. Ces substances inconnues sont également essentielles, puisqu'aucun développement ne se produit en leur absence.

Tableau 9.

B ₁	I	H	Poids mgr.	Flavine γ
10 γ	—	—	0,2	5
—	1 mgr.	—	0,1	1,25
—	—	0,06 γ	11,9	225
10 γ	1 mgr.	—	0,09	5
10 γ	—	0,06 γ	13,1	250
—	1 mgr.	0,06 γ	16,1	225
10 γ	1 mgr.	0,06 γ	37,3	250
Peptones seules			0	0
Vitamines seules			0	0

L'action de la biotine, facteur essentiel, est quantitative. Dans l'expérience indiquée par le tableau 10 nous constatons que l'effet commence à s'exprimer avec 1×10^{-5} γ. La dose de 1×10^{-3} est optimale dans les conditions de nos expériences. La courbe de la flavinogenèse a la même allure que celle du développement pondéral des cultures.

Tableau 10.

Cultures de 9 jours, sur milieu glucose-glycocolle, 1 cm³ de peptone traitée (filtrat) Witte par fiole. Pour chaque mesure 6 cultures.

	γ biotine p. 25 cm ³					
	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
Poids sec mgr.. .	1,8	1,9	2,0	1,6	0,65	moins de 0,1 mgr.
Flavine, γ . . .	125	75	100	75	3,75	0
Rapport poids sec/flavine	14,4	25,3	20,0	21,3	17,3	—

Contrôle: 1 cm³ de peptone non traitée: 4,3 mgr., 350 γ flavine, rapport poids sec/flavine 12,3.

Ce tableau indique l'action de la biotine seule, sans les facteurs complémentaires.

L'action *quantitative* de la biotine s'exprime ici par une expérience de *durée limitée*. Nous ne savons pas ce qui se passe avec les diverses doses de biotine au cours d'expériences en fonction du temps. Fries, au cours d'expériences avec *Ashbya gossypii*, a émis l'hypothèse que la biotine pourrait avoir une autre action que l'aneurine; elle ne serait pas quantitative, mais une quantité minimale pourrait, avec le temps, suffire à produire un développement intense. Au cours d'expériences avec *Trichophyton* (*Schopfer et Blumer*), nous avions également conclu à une action quantitative de la vitamine H. La question ne peut pas être résolue ici. Remarquons encore une fois que pour *Eremothecium*

l'affirmation que l'action de la biotine est quantitative est basée sur une expérience de durée limitée.

L'action de la peptone traitée est quantitative également, comme l'indique l'expérience suivante, faite sur un milieu glucose-glycocolle contenant 10 γ d'aneurine, 1 mgr. d'inositol et 0,06 γ de biotine.

Tableau 11.

	cm ³ peptone traitée (Witte)						
	0	0,05	0,1	0,5	1	2	4
Poids mgr.	moins de 0,1	0,85	2,10	9,53	13,20	22,28	19,95
Flavine γ, p. 25 cm ³ .	0	7,5	13	50	100	125	150

De quelle manière agit la peptone traitée, qui semble aussi indispensable que la biotine ? Elle peut agir : 1) en modifiant les caractéristiques physico-chimiques du milieu, p_H , etc. ce qui paraît peu vraisemblable ; 2) en apportant d'autres vitamines non adsorbées par la norite. Une expérience d'ensemble faite avec la β -alanine, l'acide pantothénique, l'adermine, l'acide nicotinique, l'acide p-aminobenzoïque, la riboflavine, l'adénosine, employés seuls ou en combinaisons diverses en remplacement de la peptone traitée, n'ont conduit à aucun résultat positif. S'il s'agit d'un facteur de croissance, celui-ci reste à identifier ; 3) elle peut agir comme antagoniste d'ions inhibiteurs, présents dans le milieu et apportés par l'eau distillée ou introduits comme impuretés par les constituants du milieu. Cette hypothèse n'a pas été examinée à fond ; 4) par les catalyseurs minéraux qu'elle apporte et dont la présence serait indispensable à l'action des vitamines ; 5) elle peut enfin agir comme source d'azote en apportant une constellation particulière d'acides aminés intervenant comme aliment ou comme microaliment. Nous avons déjà relevé le fait remarquable que la bacte-protone qui contient de la biotine (0,02 γ/gr.), mais très peu d'acides aminés libres est inactive. Le filtrat des diverses peptones traitées donne encore une réaction à la ninhydrine fortement positive. Les recherches, déjà avancées, faites au sujet du mode d'action des peptones traitées indiquent que ce sont les hypothèses 4 et 5 qui peuvent nous conduire au but.

4. Intensité de la flavinogenèse.

On ne peut manquer d'être frappé par la quantité extrêmement élevée de flavine formée, en un temps relativement court, par *Eremothecium Ashbyii*. La pratique des facteurs de croissance habite le biologiste à travailler avec de très petites quantités de vitamines. Pour exprimer la haute activité d'un facteur de croissance requis par une espèce auxo-hétérotrophe, nous utilisons une manière de « coefficient économique » exprimant le rapport existant entre la quantité de matière vivante sèche produite et la dose de facteur vitaminique

requis à cet effet. (*Schopfer* 1934, *Schopfer et Blumer* 1938, *Fries* 1938). Les chiffres obtenus sont naturellement très élevés et donnent une image frappante de l'intensité d'action de ces catalyseurs biologiques. Ces rapports ont été établis jusqu'à maintenant pour des espèces auxo-hétérotrophes : ils indiquent dans ce cas un rapport de nécessité¹⁾.

Si la possibilité existe d'analyser exactement la quantité de vitamine produite par un organisme auxo-autotrophe, il est possible d'établir également un rapport identique qui, dans ce cas, sera un rapport de biosynthèse. Les deux rapports devraient en principe concorder et, pour une même vitamine, requise dans un cas et fabriquée dans l'autre, exprimer des ordres de grandeur identiques. Cette conception est basée sur le principe suivant : le besoin en facteurs vitaminiques exprimé par une espèce auxo-hétérotrophe est déterminé par une perte de pouvoir de synthèse. Le facteur requis doit être absorbé par l'organisme et être intégré — au bon endroit — dans l'édifice de la matière vivante. Il doit y jouer exactement le même rôle que dans la matière vivante de l'espèce auxo-autotrophe qui le synthétise. Il ne peut exister aucune différence quant au mode d'action entre le facteur requis et le facteur synthétisé ; la seule différence réside dans la manière dont le facteur est acquis par l'organisme qui en a besoin : reçu de l'extérieur, ou fabriqué à l'intérieur.

A la réflexion, on peut se persuader qu'une dissemblance entre les deux rapports ne serait pas étonnante. En effet, pour les espèces auxo-hétérotrophes, la dose de vitamine requise représente la quantité minimale, juste suffisante, sans aucun excès, pour obtenir dans des conditions données un poids déterminé de matière vivante. Pour les espèces auxo-autotrophes il s'agit au contraire de la quantité totale de vitamine fabriquée et recelée non seulement par le thalle, mais diffusée dans le milieu au cours de sa biogenèse. Dans ce dernier cas, on peut s'attendre à un excès. Les données qui suivent nous renseigneront à ce sujet (voir ici le tableau 12, p. 1030).

1) *Schopfer* 1934²⁾. — 2) *Schopfer et Blumer* 1938³⁾. — 3) *Schopfer* 1938⁴⁾. — 4) *Fries* 1938⁵⁾. En considérant que la biotine agit quantitativement, après une durée d'expérience limitée (15 jours), en présence de 10 mgr. d'inosite. — 5) En présence de 10 mgr. d'inosite et de 1 γ d'anéurine. *Nematospora gossypii* = *Ashbyia gossypii*. — 6) *Schopfer* 1943⁶⁾. Température 18°, poids de thalle maximum, biotine totale (thalle et milieu); sous la dénomination de biotine est comprise la biotine + un facteur différent, qui ne prend qu'une part faible à l'action auxogène et dont la nature n'est pas connue. — 6a) En ne tenant

1) W. H. Schopfer, Erg. Biol. 16, 1—172 (1939); W. H. Schopfer, Plants and Vitamins, Chronica botanica, Waltham, 300 pp., 1943.

2) W. H. Schopfer, Arch. Mikrobiol. 5, 513 (1934).

3) W. H. Schopfer und S. Blumer, Arch. Mikrobiol. 9, 305 (1938).

4) W. H. Schopfer, Protoplasma 31, 105 (1938).

5) N. Fries, loc. cit.

6) W. H. Schopfer, Z. Vitaminforschung 14, 42 (1943).

compte que de la biotine présente dans le thalle. — 6b) Avant l'obtention du poids maximum, biotine totale (thalle + milieu). — 6c) En ne tenant compte que de la biotine présente dans le thalle. — 7) En présence de peptone de soie. — 7a) En présence de protéose-peptone; riboflavine totale.

Le coefficient pour les espèces auxo-autotrophes n'a qu'une valeur très relative, par le fait que l'intensité de la biosynthèse dépend dans une large mesure des conditions culturales.

Tableau 12.

Espèce	Poids culture mgr.	Vitamine requise γ	Coefficient
<i>Espèces auxo-hétérotrophes.</i>			
1. <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	100	0,5	200 000
2. <i>Ustilago violacea</i>	25	0,01	2 500 000
3. <i>Dematium nigrum</i>	20	0,02	1 000 000
Biotine			
4. <i>Nematospora gossypii</i> . . .	9,8	0,01	980 000
4a. <i>Nematospora gossypii</i> . . .	11,0	0,01	1 100 000
5. <i>Eremothecium Ashbyii</i> . . .	2,0	0,001	2 000 000
Espèce	Poids culture mgr.	Vitamine synthétisée γ	Coefficient
<i>Espèces auxo-autotrophes.</i>			
6. <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .	95 mgr.	0,28786	330 022
6a. id.	95 mgr.	0,065	1 461 538
6b. id.	74 mgr.	0,190	389 474
6c. id.	74 mgr.	0,029	2 551 724
Riboflavine			
7. <i>Eremothecium Ashbyii</i> . . .	0,3	375	0,8
7a. id.	7,4	175	42,3

Si nous comparons les coefficients pour la biotine, chez les espèces auxo-autotrophes et auxo-hétérotrophes, nous constatons que les chiffres sont du même ordre de grandeur, à la condition de ne tenir compte que de la biotine synthétisée et retenue dans le thalle de *Phycomyces*, et en négligeant celle diffusée dans le milieu. Nous avons dit plus haut les raisons pour lesquelles la comparaison des deux coefficients ne devait être faite qu'avec prudence, et dans des conditions bien déterminées. Le but de ce tableau comparatif est avant tout de mettre en valeur la position exceptionnelle d'*Eremothecium Ashbyii* au sujet de la biosynthèse de la riboflavine. Le tableau 12 nous indique pour les diverses peptones les coefficients obtenus. Nous constatons qu'ils ne dépassent pas 42,3 et qu'ils peuvent être inférieurs à 1: dans ce cas le microorganisme synthétise un poids de vitamine dépassant celui de la matière vivante siège de la biosynthèse. A première vue, ce phénomène apparaît comme une véritable

monstruosité physiologique. Pour parvenir à la justifier, il faut admettre que la substance ne fonctionne plus comme vitamine, mais comme substance de réserve, ou comme produit d'élimination.

Remarquons encore que la flavine se produit chez *Eremothecium* dans des conditions particulières, non pas en anaérobiose comme c'est le cas pour la majorité des bactéries étudiées, mais en aérobiose, partielle tout au moins. Ce fait qui a déjà été mis en évidence par Mlle Raffy¹⁾, confère à la flavinogenèse d'*Eremothecium* un intérêt particulier. Il sera étudié dans un autre mémoire, le présent travail n'ayant pour but que d'établir la constellation de facteurs vitaminiques nécessaires au développement du champignon.

Conclusions.

1. *Eremothecium Ashbyii* peut être cultivé sur divers milieux naturels contenant des extraits végétaux ou animaux. Les milieux à base de peptone sont modérément actifs en ce qui concerne le développement, mais très favorables à la production de flavine.

2. Une peptone traitée par la norite est inactive. L'aneurine, la biotine et le méso-inositol employés seuls sont sans action, mais ajoutés au filtrat de peptone traitée, déterminent la croissance du microorganisme. Le filtrat de peptone agit quantitativement. Il en est de même pour la biotine, au cours d'une expérience de durée limitée. L'activité des peptones, variable selon la nature et l'origine de ces dernières, peut donc s'expliquer en partie par leur teneur en biotine et en aneurine, et par leur teneur en substances non encore déterminées, se retrouvant dans le filtrat et manifestant un synergisme d'action avec les vitamines requises. Il est peu probable qu'en présence de peptone, le champignon devienne auxo-autotrophe.

3. L'auxo-hétérotrophie d'*Eremothecium Ashbyii* est analogue à celle d'*Ashbya gossypii*: la biotine est un facteur de croissance essentiel, sans lequel aucun développement ne se produit, et suffisant seul à assurer la croissance. L'aneurine et le méso-inositol sont des facteurs de croissance complémentaires, amplifiant l'action de la biotine. L'hétérotrophie d'*Eremothecium* est cependant plus marquée que celle d'*Ashbya* par le fait que les substances du filtrat de peptone sont nécessaires.

4. Le champignon est le siège d'une flavinogenèse intense qui se marque sur divers milieux naturels, mais particulièrement en présence de peptones. Il n'y a pas de corrélation absolue entre la flavinogenèse, la production de matière sèche et la teneur des peptones en biotine. Il existe des conditions spécifiques de la flavinogenèse.

5. Le fait que la constellation de facteurs de croissance pour *Eremothecium Ashbyii* est analogue à celle d'*Ashbya gossypii*, mais

¹⁾ Mlle A. Raffy, C. r. 209, 900 (1939).

plus complexe est une nouvelle preuve à l'appui du principe de l'indépendance systématique et de la polytopie de l'auxo-hétérotrophie. La complexité des pertes de pouvoir de synthèse est indépendante de la position systématique des organismes: dans un même genre, des espèces très voisines peuvent exprimer des besoins différents.

Nous exprimons notre reconnaissance aux Etablissements *F. Hoffmann-La Roche*, et particulièrement au Dr. *M. Guggenheim* pour les vitamines qu'il nous a fait aimablement parvenir. Nous remercions Mlle *M. Guilloud*, laborantine, pour sa collaboration. Nous sommes redevable de la lampe Hanau utilisée pour ces recherches à la *Fondation pour l'encouragement aux recherches scientifiques de l'Université de Berne*.

Institut et jardin botaniques de l'Université de Berne.

119. Über eine Eichsubstanz für spektrographische
Absorptionsmessungen¹⁾

von H. v. Halban und K. Wieland.

(20. V. 44.)

Es sind in Zeitschriften und Monographien verschiedene Methoden und Anordnungen zur spektrographischen Ermittlung der Lichtabsorption beschrieben worden. Letztere können zum Teil fertig bezogen werden. Tatsächlich hat sich in den dreissig Jahren, seit *V. Henri*²⁾ die erste praktisch brauchbare Methode der Absorptions-spektrographie beschrieben hat, die Anwendung der Absorptions-spektrographie unter den Chemikern ausserordentlich verbreitet, und heute verfügt wohl die Mehrzahl der chemischen Institute über einen Spektrographen. Es gibt aber unter den physikalischen Konstanten, die bei chemischen Untersuchungen bestimmt werden, kaum eine, bei deren Ermittlung gelegentlich mit so ungenügender Kritik vorgegangen wird und bei der die Genauigkeit und Richtigkeit³⁾ der Ergebnisse von den betreffenden Autoren so falsch eingeschätzt wird, wie dies bei der Bestimmung der Lichtabsorption der Fall ist. Es ist vorgekommen, dass ein Autor als Fehlergrenze seiner spektrographisch ermittelten Werte des molaren Extinktionskoeffizienten 5% angab, während die Fehler tatsächlich um mehr als zwei Zehnerpotenzen grösser waren.

¹⁾ Eine kurze vorläufige Veröffentlichung darüber findet sich in *Helv. phys. acta* 15, 525 (1942).

²⁾ *V. Henri*, *Phys. Z.* 14, 516 (1913).

³⁾ Gerade die Unterscheidung zwischen den Begriffen Genauigkeit und Richtigkeit spielt auf diesem Gebiet eine besondere Rolle und wird häufig ausser acht gelassen. Es sei darauf hingewiesen, dass man mit der photoelektrischen Zweizellen-Apparatur auf Bruchteile von Promillen genau messen kann, dass aber die Richtigkeit der absoluten Werte der so erhaltenen Extinktionskoeffizienten je nach der Lichtquelle um mehrere Prozente unsicher sein kann. Vgl. *G. Kortüm* und *H. v. Halban*, *Z. physikal. Ch. [A]* 170, 212 (1934).