REVUE CRITIQUE

LA DIFFUSION DANS LA GÉLOSE ET SES APPLICATIONS A L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES MICROORGANISMES

Par Ph.-J. LUTERAAN

I. METHODES ET RÉSULTATS GÉNÉRAUX

Dans le présent mémoire, nous exposons le résultat de nos recherches concernant l'action de facteurs de croissance ou d'inhibition sur le métabolisme glycidique et azoté de microorganismes unicellulaires.

Ces résultats ont été obtenus par l'application de la méthode de Beijerinck. Elle consiste à faire diffuser dans une couche de gélose, renfermant une dilution aussi uniforme que possible de levures ou de bactéries et étalée dans une boîte de Petri, une substance dont on veut étudier l'action biologique. La diffusion de la substance réalise une *zonation* ; cette zonation est visible si la substance est colorée, elle peut être fluorescente aux rayons ultra-violet ; enfin, dans le cas qui nous occupe, une zonation apparaît, même avec des substances incolores et non fluorescentes, s'il y a assimilation de ces substances par les microorganismes, ou si au contraire elles exercent une action inhibitrice.

Historique. — Beijerinck, le premier, en 1889, a vu le parti que l'on pouvait tirer des phénomènes de diffusion dans les gels pour l'étude du métabolisme glycidique et azoté des bactéries (1).

Tombée dans l'oubli, sa méthode fut reprise en 1934 par Lodder qui l'utilisa comme un des éléments de détermination des espèces de levures anascospores.

La méthode auxanographique de Beijerinck fut rendue pratique et sûre par Langeron et Guerra (1938) ; par un artifice, ils évitèrent

(1) Le métabolisme des lipides n'a jamais été étudié par sa méthode.

la chute d'eau de condensation à la surface de la couche de gélose ; c'était là une cause presque fatale d'erreur ou d'indétermination dans l'interprétation des résultats.

Poursuivant un but différent (reconnaissance de substances antibiotiques et dosage de la pénicilline), Heatley (1944), grâce à un anneau ou cylindre en porcelaine, verre ou aluminium, posé à la surface de la gélose, a rendu facile l'étude de la diffusion de substances liquides.

Avec Denis (1946), nous avons modifié la méthode auxanographique primitive de Beijerinck :

- en la rendant quantitative dans tous ses éléments ;
- en l'appliquant non seulement aux substances pulvérulentes, mais aux substances liquides par l'artifice de Heatley ;
- en en faisant une méthode plus générale, applicable non seulement à l'étude des phénomènes d'assimilation, mais à celle des facteurs de croissance ou d'inhibition.

Enfin, personnellement, en accord avec les vues générales de Langeron, j'ai tenté, par cette méthode de Beijerinck, d'approfondir le mécanisme d'action de certaines substances sur des organismes unicellulaires.

Diversité d'aspect des phénomènes de diffusion en gélose.

— Les lois physico-chimiques de la diffusion dans les gels ont fait l'objet d'études nombreuses et approfondies de la part de physiciens comme Adair, Morce et Pierce, Jableczynski, Duclaux, Salvinien, etc... ; elles ont une grande importance en biologie ; elles se résument en deux ordres de lois : lois des temps et lois des abscisses.

La diffusion, dans le cas qui nous occupe, dépend de multiples facteurs, dont les principaux sont :

- la nature de la substance diffusante, sa concentration, sa solubilité ;
- la nature du gel, son hydratation, sa concentration, son épaisseur ;
- la température, le pH.

Il y a donc impossibilité, à moins de cas théoriques très simples, de déterminer par une relation mathématique la concentration en un point, et pour un temps déterminé, de la substance diffusante.

Quelques exemples exprimeront la diversité d'aspect des phénomènes de diffusion :

Nous n'insisterons pas sur la diffusion banale des colorants réalisant des zonations d'étendue très différente et qui dépend surtout de leur solubilité.

La planche II représente la zonation si connue des *Penicillium*,

Aspergillus, etc... Elle s'obtient facilement en cultivant un *Penicillium* sur plaque de gélose mince, peu hydratée, pauvre en substances nutritives, et maintenue immobile. Cette zonation est celle des anneaux de Liesegang.

Sur la figure 1, on constate un phénomène découvert par Langeron et Guerra : si on fait une culture sur lame de certaines levures en procédant par stries parallèles et rapprochées, les levures filamentent et produisent un pseudo-mycélium qui est orienté vers les bords de la lame ; mais, entre les stries, il n'y a pas d'ébauche

Fig. 1. — Influence réciproque des stries d'ensemencement du *Candida tropicalis*. D'après Langeron et Guerra, 1940.

de filament. Ce phénomène est général, se constate avec d'autres champignons, et s'explique par la diffusion rétrograde des substances nutritives entre les stries.

TECHNIQUE

A. Méthode de Beijerinck. — La technique de l'auxanogramme est exposée avec détails par Langeron, Langeron et Guerra, et nous ne saurions mieux faire que de renvoyer à ces auteurs (1).

Les seules modifications que nous y apportons sont liées au but expérimental poursuivi ; aussi, pour plus de clarté, décrirons-nous la technique poursuivie lorsque nous exposerons nos résultats concernant le mécanisme d'action de substances diverses agissant sur des organismes unicellulaires.

(1) Ces Annales, XVI, 1938, p. 164-172 et 506-507 (fig. 1 et 2).

M. LANGERON, *Précis de mycologie*, Paris, Masson et Cie, 1945 ; cf. p. 484-489.

Un des avantages, et non des moindres, de cette méthode, est sa simplicité.

Dans le présent chapitre, nous retiendrons l'attention sur deux points particuliers :

- la méthode de Heatley ;
- l'adaptation des techniques aux microorganismes bactériens.

FIG. 2. — Pince à seringue du D^r Sancey : en haut, mode d'emploi ; en bas, schéma de la pince.

B. Méthode de Heatley. — Nous lui appliquons la technique suivante :

- partir d'une culture jeune de levures en milieu solide (gélose glycosée à 2 % et peptonée à 1 % de Langeron) ;

- prélever une anse, la diluer dans 2 cm³ d'eau stérile et effectuer une numération des éléments ;

- prélever 1 cm³ de cette dilution avec une seringue et une aiguille très longue stériles ;

- plonger la pointe de l'aiguille en pleine gélose (20 cm³) liquéfiée contenue dans un tube à essai. Pousser fortement le piston de la seringue en maintenant l'embout de l'aiguille ;

- retirer l'aiguille, émulsionner fortement en roulant le tube entre les paumes ;

- verser la gélose encore liquide dans une boîte de Petri de 10 cm. de diamètre ;

- une heure après, poser l'anneau stérilisé à la surface de la gélose, en son centre, à l'aide d'une pince à seringue (fig. 2) (pince du D^r Sancey). L'anneau est en verre épais de 1 cm. 5 de diamètre intérieur sur 1 cm. de hauteur ;

- une demi-heure après la pose de l'anneau (il adhère alors bien), y verser 1 cm³ de la substance liquide ou en solution, solution dont on fait varier les concentrations au cours d'expériences successives ;
- porter à l'étuve à 20° C. ;
- noter les résultats de 24 h. en 24 h. : aspect des zonations, leur diamètre en cm. que l'on porte en ordonnée sur un graphique en fonction du temps (abscisses) en jours (fig. 3). On peut aussi, pour un temps déterminé, étudier les variations du diamètre de zonation en fonction de la concentration de la substance diffusante.

FIG. 3. — Action de la nicotinamide :
en pointillé, courbe de la zonation d'hyperactivité.

La méthode de Heatley n'est pas une méthode précise de dosage, pour les raisons suivantes :

- les diamètres de zonation (fig. 3) ne sont proportionnels ni à la quantité de liquide, ni à sa concentration ;
- le nombre de microorganismes déterminé par numération est assez variable ;
- les géloses commerciales sont de qualité très différente ;
- la teneur en eau du gel se modifie constamment du fait de l'évaporation et du métabolisme cellulaire ;
- l'épaisseur de la couche de gélose est variable, car les boîtes de Petri ont rarement un fond plat ;
- on ne peut déterminer directement la concentration en un point de la substance diffusante.

Mais si, au point de vue quantitatif, la méthode de Heatley doit céder le pas à d'autres méthodes (méthode des dilutions, méthode néphélométrique de Lwoff et Querido, etc...), elle apporte en tant

que méthode de diffusion des résultats qualitatifs particulièrement intéressants : la quantité plus ou moins rapidement dégressive de la substance diffusante à partir du centre de diffusion permet d'observer, pour un temps donné, des effets très différents : soit multiplication intensive des cellules, soit inhibition, suivant les zones. Cette méthode démontre qu'une substance donnée n'a pas une action univoque à l'égard de microorganismes unicellulaires.

C. Adaptation des méthodes précédentes aux microorganismes bactériens. — Créée par Beijerinck pour l'étude des phénomènes d'assimilation par les bactéries, la méthode auxanographique avait été délaissée dans ce domaine particulier en raison de la difficulté de son application et de l'interprétation de ses résultats.

Analysant la cause de cet échec, nous avons remarqué que la principale difficulté était d'obtenir des émulsions homogènes de bactéries dans le gel, et que ceci tenait à la qualité des milieux bactériologiques ordinaires : compacts, fortement alcalinisés, de composition mal définie, stérilisés longuement, à point de liquéfaction élevé, à mauvaise diffusion.

Nous avons donc changé, en vue du but expérimental poursuivi, le mode de préparation et de stérilisation en nous conformant aux techniques de Langeron utilisées en mycologie.

Nous employons des milieux type Gorodkova ou Langeron, en y adjoignant des facteurs de croissance convenables suivant les germes, par exemple :

Eau distillée	500 cm ³
Peptone bactériologique sans indol	5 gr.
Glycose pur	5 gr.
Gélose lavée (1)	25 gr.
Aneurine	0 gr. 004
Nicotinamide	0 gr. 10

Précautions capitales :

- verrerie préalablement stérilisée ;
- stérilisation du milieu suivant la technique habituelle de Sabouraud-Langeron : monter en 20 minutes à 120° et éteindre à ce moment ;

(1) Pour laver la gélose, mettre 25 gr. de gélose sous le jet du robinet pendant 2 à 3 heures ; la gélose enfermée dans un linge parfaitement propre est essorée de temps à autre. Ensuite deux ou trois bains d'eau distillée entre lesquels onessore chaque fois la gélose. On verse enfin avec une cuiller la gélose dans un Erlenmeyer préalablement taré. Pour compléter à 500 cm³ d'eau distillée et si G est le nouveau poids de la gélose après lavage, on rajoute la quantité d'eau distillée P : $P = 500 - G + 25$ gr.

— décanter soigneusement avant de répartir en tubes, et alors nouvelle stérilisation suivant la même technique.

Les avantages des milieux de type précédent sont :

- le point de liquéfaction relativement bas ;
- l'absence d'alcalinisation, donc pas d'altération des sucres ou du moins de transformation en acides uroniques ;
- le pH acide, d'où facilité d'essais, comme antibiotiques, de liquides acides où se sont développés des champignons ; on n'a pas alors besoin d'alcaliniser ces liquides au risque d'altérer leur composition, et on n'a pas, non plus, à discuter cette cause d'erreur, à notre avis capitale, pour la détermination d'une activité antibiotique réelle qu'est l'acidité de la solution diffusante ;
- la diffusion rapide et beaucoup plus importante que dans les milieux ordinaires ; c'est là un avantage incontestable pour l'étude de l'action de substances à grosses molécules ou faiblement diffusibles ou solubles.

La plupart des germes banaux : staphylocoque, bacille diphtérique, bacille pyocyanique, colibacille, bactérie charbonneuse, etc..., s'y développent très bien, particulièrement en émulsion homogène beaucoup plus difficile à obtenir avec les milieux bactériologiques ordinaires.

Telles sont les modifications qui permettent l'application des méthodes de diffusion aux microorganismes bactériens. Il sera facile, en s'en inspirant, de pratiquer leur auxanogramme, comme nous le verrons plus loin.

RÉSULTATS OBTENUS

Action biologique de substances diverses sur les microorganismes. — Pour l'étudier nous avons eu recours, avec Denis, à la méthode de Heatley.

Nous avons principalement expérimenté, sur la recommandation de Langeron, avec le *Candida krusei*, en raison du développement rapide et facile de cette levure ; nous nous sommes servis aussi du *Candida parakrusei*, du *Torulopsis neoformans* (syn. : *histolytica*), agent d'une blastomycose humaine toujours mortelle, du *staphylocoque*, du *bacille diphtérique*, du *bacille pyocyanique*.

Les substances essayées furent :

- des vitamines (1) ;
- des hormones ;

(1) Les vitamines utilisées sont des vitamines Roche : bérnerva, bévitine, béflavine et lactoflavine, bérnadon, bérpanthène en solution aqueuse ; thyroxine Roche, Lutogyl Roussel, Théophylline Bruneau, Colchicéol Houde.

- un facteur d'élongation ;
- des substances biologiques très diverses ;
- des colorants ;
- des inhibiteurs de fermentation.

Vitamines

1° *L'aneurine* (fig. 1, pl. III), à la dose de 2 mg., provoque une triple zonation :

la plus proche de l'anneau correspond à une zone de multiplication cellulaire intensive ;

la zone intermédiaire, fait paradoxal, se présente comme une zone d'inhibition, peut-être par diffusion rétrograde ;

la zonation périphérique, comparée à un témoin (1), correspond à une activité cellulaire normale.

2° *La lactoflavine* (fig. 2, pl. III) est antibiotique à l'égard du *Candida krusei* et du *Torulopsis neoformans*.

Cette action antibiotique *in vitro* et *en aérobiose* se traduit sous deux formes :

— action inhibitrice avec une zonation atteignant encore 6 cm. 8 de diamètre pour une dose de 0 mg. 5 de lactoflavine diffusant dans 20 cm³ de gélose glycosée à 2 % et peptonée à 1 % ;

— action fongicide (2) qui s'observe en faisant diffuser la lactoflavine dans un milieu de culture ayant atteint son plein développement ; il n'y a pas alors de lyse des corps cellulaires trop épais, mais les divers ensemencements pratiqués à partir de la zone colorée sont restés négatifs.

Action inhibitrice et action fongicide s'étendent même au delà de la zone colorée par la lactoflavine.

L'action antibiotique est encore plus considérable si, dans le milieu, on remplace la peptone par le sulfate d'ammonium, normalement très bien assimilé par ces levures.

Ces faits paraissent encore plus paradoxaux si l'on songe que la lactoflavine a été isolée pour la première fois de la levure de bière et qu'elle est sécrétée en grande abondance par un autre champignon, l'*Eremothecium ashbyi* (Guilliermond).

(1) On ne saurait trop insister sur la nécessité de pratiquer des témoins, ensemencés dans les mêmes conditions avec la même dilution, laissés à la même température, mais sans traces de la substance à étudier ; en l'absence de témoin, l'interprétation des résultats ne saurait être valable.

(2) Cette action n'est pas due à la formation de lumiflavine, car nous avons eu soin de laisser nos préparations à l'obscurité ; à plus forte raison, nous ne les avons jamais exposées aux rayons ultra-violet pour rechercher la fluorescence.

La lactoflavine n'a pas d'action inhibitrice à l'égard des *Penicillium*, du *Torula gougeroti*, du *Ctenomyces radians*, agent de teignes épidermiques.

La lactoflavine provoque une zonation d'hyperactivité avec le *bacille pyocyannique* ; elle n'a pas d'action élective sur le *bacille diphtérique* ou le *staphylocoque*.

Avec A. Akakpo, nous avons pu constater l'absence d'action *in vivo* de la lactoflavine sur le *Trypanosoma congolense* et le *Plasmodium gallinaceum*.

Les recherches sur l'action à l'égard du *bacille pyocyannique* et du *Plasmodium gallinaceum* ont été motivées par certaines analogies de structure chimique entre la lactoflavine et des composés tels que la pyocyanine et l'atébrine. Nous reviendrons, dans nos conclusions, sur l'importance de ces analogies chimiques.

3° La *nicotinamide* (fig. 3, pl. III), à la dose de 5 cg., provoque une triple zonation :

l'une interne et concentrique à l'anneau est une zone d'inhibition ; l'autre, intermédiaire, est une zone d'hyperactivité ;

la zonation périphérique atteste encore une activité accrue.

4° L'*adérmine* favorise le développement du *Candida krusei*, mais est indifférente à l'égard du *Candida parakrusei*.

5° L'*acide pantothénique*, à la dose de 0 gr. 025, stimule le *Candida krusei*, mais inhibe plutôt le *Candida parakrusei*.

Hormones

1° La *thyroxine*, à la dose de 1 mg., provoque une zonation d'inhibition de plusieurs centimètres de diamètre, mais qui avec le temps diminue considérablement. Nous insisterons sur ce dernier point, car il démontre la mise en évidence facile, grâce à la méthode de diffusion, de l'altération d'un catalyseur ou de son usure. On sait qu'une des notions générales importantes et modernes de la physiologie est la relation, dans bien des cas à établir, entre la vitesse et le mode de destruction d'une substance d'une part, et son action physiologique d'autre part.

2° L'*hormone du corps jaune* donne lieu à une zonation d'hyperactivité ; mais ici intervient la nature du solvant (huileux, dans d'autres cas alcoolique) qui rend délicate l'interprétation des résultats si on n'a pas soin de pratiquer des expériences témoins où intervient le solvant seul. C'est pour cette raison que nous n'avons pas étudié l'action de certaines vitamines ; en ce qui concerne la

vitamine C, c'est son instabilité qui nous a fait abandonner toute expérimentation.

Facteur d'élongation. — L'acide β -indol-acétique donne lieu à une légère zonation d'hyperactivité, mais sans modification morphologique du *Candida krusei* ; ce dernier point est confirmé par des cultures sur lames que nous avons faites sur des milieux additionnés de cette substance. Le principal facteur d'élongation pour les levures est l'anhydride carbonique, comme l'ont démontré Langeron et Guerra par des cultures sur lames en atmosphère carbonique.

Substances biologiques diverses

1° La *théophylline* (fig. 4, pl. III), à la dose de 6 cg., provoque une triple zonation :

zonation interne d'inhibition (avec toutefois présence de colonies isolées concentriques à l'anneau) ;

zonation intermédiaire d'hyperactivité avec extinction de la fluorescence aux rayons ultra-violet ;

zonation périphérique d'activité normale pour le *Candida krusei*.

2° La *bile* provoque de multiples zonations.

3° L'*extrait hépatique* provoque une zonation d'hyperactivité manifeste.

4° C'est en vain que nous avons recherché une réaction particulière avec les urines de femme enceinte et le *prolan* en vue d'établir une méthode de diagnostic biologique de la grossesse.

5° La *colchicine* n'a pas d'action inhibitrice. Elle ne provoque aucune modification morphologique apparente du *Candida krusei*.

Colorants

Le *rouge Congo* à la dose de 0 mg. 1 provoque une zonation légère d'hyperactivité.

D'autres colorants : *éosine*, *fuchsine acide*, *bleu de méthylène*, *vert de méthyle*, *jaune d'acridine*, n'ont aucune action caractéristique.

Nous avons recherché une action possible des colorants en raison du développement fréquent de certains champignons dans des tubes de colorant abandonnés à l'air. Nous avons observé notamment que pour un certain *Penicillium* antibiotique isolé par nous, le vert de méthyle en solution aqueuse constitue un excellent milieu de culture ; nous ferons remarquer également que la colchicine n'est pas toxique pour ce *Penicillium*.

Inhibiteurs de fermentation

Le fluorure de sodium à la dose de 0 mg. 1 provoque une légère zonation d'hyperactivité ; il s'agit bien entendu d'une action en aérobiose.

RÉSUMÉ

De cette première étude, concernant l'action générale de diverses substances sur les microorganismes, se dégagent les points essentiels suivants :

1° Une même substance peut agir très différemment suivant sa concentration.

2° De nombreuses substances agissent occasionnellement comme facteurs de croissance.

3° Là où l'on aurait pu attendre une action favorisante ou du moins indifférente, on constate une action antibiotique : c'est le cas de la lactoflavine.

Chacune de ces substances doit agir électivement sur une ou plusieurs phases de l'anabolisme ou du catabolisme cellulaire. C'est cette hypothèse que nous chercherons à démontrer dans la suite de ce mémoire. Nous y parviendrons grâce à cette méthode essentiellement biologique qu'est la méthode auxanographique de Beijerinck et en nous appuyant sur quelques exemples démonstratifs.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE II

Zonation des *Penicillium* : anneaux de Liesegang formés dans trois colonies de *Penicillium* non déterminés, souillures accidentelles en boîtes de Petri.

PLANCHE III

Action de substances diverses sur *Candida krusei* : zonation en boîte de Petri, méthode auxanographique de Beijerinck avec anneau de Heatley. — 1, aneurine (2 mg.) ; 2, lactoflavine (1 mg. 125) ; 3, nicotinamide (0 gr. 05) ; 4, théophylline (0 gr. 06).

1

2

3

4

II. MECANISME DE L'ACTION PAR DIFFUSION

Nous venons d'exposer l'action de substances diffusant en gélose sur des microorganismes ; cette action était traduite par des zonations témoignant d'une assimilation accrue ou d'une action empêchante.

Il nous reste à indiquer le mécanisme de cette action, à déterminer sur quel élément azoté ou glycidique elle s'exerce électivement. Pour cela, nous avons eu recours à la *Méthode auxanographique de Beijerinck*, telle que l'avait conçue primitivement son auteur et pour le but même qu'il lui avait assigné.

1. La *technique de l'auxanogramme*, tel que nous le pratiquons, est, dans l'ensemble, celle qui est décrite par Langeron et par Langeron et Guerra. Elle comporte les différences suivantes :

1° la gélose est toujours lavée et filtrée, qu'il s'agisse d'auxanogramme de substance glycidique ou azotée, de façon à avoir un milieu de base relativement synthétique (1) ;

2° cette gélose est répartie en tubes à raison de 22 cm³ par tube, ce qui revient, après refroidissement, à 20 cm³ ;

3° elle est additionnée, au moment de son emploi :

soit de 0 gr. 20 d'une substance azotée telle que l'asparagine ou l'urée pour l'auxanogramme de substances glycidiques ou d'acides organiques tels que : acide succinique, acide citrique, acide pyruvique, acide lactique ;

soit de 0 gr. 40 d'une substance glycidique ou d'un acide organique pour l'auxanogramme de substances azotées.

Ces proportions sont celles du milieu de Langeron peptoné à 1 % et glycosé à 2 % ;

4° enfin, on incorpore à la gélose une quantité déterminée de la substance dont on veut étudier l'action sur le métabolisme des microorganismes qu'on émulsionne en fin de compte dans la gélose suivant la technique déjà décrite ;

5° on procède par ailleurs comme pour un auxanogramme ordinaire ; on note les résultats obtenus de 24 heures en 24 heures : date d'apparition des zonations, leur extension et surtout leur intensité, toujours par rapport à un témoin ne différant que par l'absence de substance à étudier.

(1) L'addition de phosphates ou de sulfate de magnésium n'est pratiquée que si on veut étudier leur action particulière.

Les résultats obtenus sont les suivants. Nous nous limiterons à l'étude de l'action de quelques substances, telle qu'elle ressort au cours d'expériences répétées.

En premier lieu, pourquoi avons-nous choisi les proportions indiquées de substance glycidique ou azotée pour le milieu de base ?

En faisant varier leurs proportions, nous avons constaté les faits suivants :

S'il n'y a pas de trace de glycose ou d'acide organique indiqué dans le milieu, il n'y a pas assimilation de substances azotées, et cette assimilation est d'autant plus précoce et plus intense que la quantité d'aliment glycidique ou dérivé augmente ; la proportion de 2 % nous a paru excellente. S'il n'y a pas d'addition de substance azotée, les traces qui peuvent en subsister dans la gélose la mieux lavée permettent l'apparition sans retard de zonations d'assimilation des glycides, mais leur netteté et leur durée d'évolution augmentent si on ajoute un aliment azoté convenable.

La méthode auxanographique confirme les résultats fondamentaux obtenus par Nielsen et Hartelius sur le rôle catalytique de l'aliment azoté, tandis que les aliments glycidiques, ayant surtout une valeur énergétique, leur rôle catalytique ne s'affirme qu'au cours de la desmolyse. L'équilibre alimentaire des levures dépend évidemment encore d'autres facteurs : *température*, c'est ainsi qu'au-dessous de 18° les zonations d'assimilation sont retardées et moins intenses pour les levures :

pH du milieu qui est modifié par l'assimilation d'une substance et suivant la nature de cette substance et de ses produits de désintégration ;

éléments indéterminés pouvant persister dans la gélose la mieux lavée.

2. Dans une *seconde série d'expériences*, nous avons étudié le mécanisme d'action de la *lactoflavine*, comme *antibiotique à l'égard des levures*. Il y avait là un premier point à établir expérimentalement : quelle est la quantité de lactoflavine à ajouter pour situer son action dans l'étape desmolytique, sans cependant tuer la levure ? En somme, c'est ici encore la discussion du seuil d'action des éléments catalytiques biologiques, qu'il s'agisse de vitamines, hormones, oligo-éléments, facteurs divers. La dose de lactoflavine permettant d'étudier son mécanisme d'action avec une grande netteté a été fixée par nous à 1 mg. 25 de lactoflavine ou béflavine Roche pour 20 cm³ de gélose à 50 gr. pour mille.

Les résultats se trouvent résumés dans les tableaux suivants :
Souche utilisée : *Candida krusei* :

TABLEAU I. — Auxanogramme de l'azote

	Peptone	Asparagine	Urée	Sulf.Amm.
Milieu glycosé témoin.....	+	+	+	+
Id. + lacto-flavine.....	+	+	+	+
Milieu témoin à l'ac. succinique.....	+	+	+	+
Id. + lacto-flavine.....	+	0	0	0
Milieu témoin à l'ac. citrique.	+	+	+	+
Id. + lacto-flavine.....	+	0	0	0

TABLEAU II. — Auxanogramme des sucres

	Glycose	Ac. succin.	Ac. citr.	Ac. pyrùv.	Ac. lact.
Milieu témoin à l'urée.....	+	+	+	+	+
Id. + lactoflavine..	+	0	0	0	+
Milieu témoin à l'asparagine.....	+	+	+	+	+
Id. + lactoflavine..	+	0	0	0	+

Nous constatons donc trois ordres de faits :

1° La peptone, le glycose et l'acide lactique continuent à être assimilés comme normalement.

2° Les produits intermédiaires résultant de la desmolyse des hexoses ne sont pas assimilés.

3° En présence de ces produits intermédiaires il y a blocage de l'assimilation de certaines substances azotées sous l'action de la lactoflavine.

Donc la lactoflavine inhibe un catalyseur ou un groupe de catalyseurs cellulaires ; substance électroactive, son potentiel d'oxydo-réduction doit révéler à quelle étape précise de la desmolyse s'exerce cette action. Une mesure effectuée au manomètre de Warburg doit révéler de son côté un blocage respiratoire.

Ajoutons que la cellule de levure tuée par la lactoflavine ne présente aucune modification morphologique apparente.

3. *Troisième série d'expériences : une action favorisante de la lactoflavine sur le bacille pyocyannique.* — L'auxanogramme des microorganismes bactériens, pour lesquels Beijerinck avait créé sa méthode, avait été délaissé en raison de ses nombreuses difficultés techniques et de l'inconstance de ses résultats. En effet, une variation, même légère, de pH peut bloquer l'assimilation par un micro-organisme bactérien, une substance parasite peut brouiller l'auxanogramme et il est impossible à cet égard de considérer la gélose comme un support absolument inerte auquel on peut incorporer un milieu synthétique, et partant considérer le nouveau milieu comme synthétique. D'ailleurs, plus encore qu'avec les levures, il est fréquent d'obtenir, avec les bactéries, des réactions d'assimilation sous l'apparence de précipitations périodiques ou phénomène de Liesegang. La gélose n'est donc un support ni physiquement, ni chimiquement inerte. Et il est incontestable que la méthode auxanographique ne saurait suppléer, pour les microbes, à la méthode néphélométrique de Lwoff et Quérido pour apprécier une assimilation et son intensité.

Ceci posé et sous ces réserves, la méthode auxanographique reste un moyen remarquable d'exploration de la physiologie microbienne, but pour lequel l'avait créée Beijerinck, si on a soin de pratiquer constamment des expériences témoins ; on peut alors conclure d'une action spécifique de la substance surajoutée dans les conditions de l'expérience.

Au surplus, cette méthode est d'application très facile à des germes qui s'accommodent facilement de variations de pH tels que le bacille pyocyannique, le staphylocoque, le bacille diphtérique, le colibacille, etc...

Souche utilisée : bacille pyocyannique.

Lactoflavine : 1 mg. 25 pour 20 cm³ de gélose.

Témoins sans lactoflavine :

TABLEAU III. — Auxanogramme de l'azote

	Peptone	Aspa ag.	Histidine	Urée	Sulf. Amm.	Nitrate K
Témoin.....	+	+	+	+	0	0
+ Lactoflavine...	+	+	++	++	0	0

TABLEAU IV. — Auxanogramme des « sucres »

	Glycose	Ac. succin.	Ac. citr.	Ac. pyruv.
Témoin (milieu à l'asparagine)...	+	+	+	+
+ Lactoflavine...	0	0	0	0

La lactoflavine bloque l'assimilation des sucres et de leurs dérivés desmolytiques, favorise l'assimilation de l'histidine et de l'urée. Nous pensons que cette action favorisante s'exerce sur la formation de la pyocyanine à laquelle la lactoflavine est liée par des homologies de structure chimique, et qui est également une substance électroactive. Ces résultats ont été constants au cours d'expériences répétées, mais seule la comparaison avec d'autres méthodes que nous n'avons pas pu pratiquer : mesure des potentiels d'oxydo-réduction et méthode manométrique de Warburg pourraient confirmer ces résultats qui contribueraient à éclairer grandement le rôle physiologique de la pyocyanine.

4. *Quatrième série d'expériences : action du fluorure de sodium sur le Candida krusei en aérobiose.* — Il faut ajouter un ou deux décigrammes de fluorure de sodium à 20 cm³ de gélose pour obtenir une réaction caractéristique. A très faible dose, le fluorure de sodium possède plutôt un pouvoir favorisant.

Avec un décigramme de fluorure de sodium, il y a simplement retard et diminution d'intensité des zonations pour les éléments intermédiaires de la desmolyse.

Ces résultats se superposent à ceux qui ont été obtenus par le fluorure de sodium comme inhibiteur de fermentation.

TABLEAU V. — Action inhibitrice du fluorure de sodium

	Peptone	Aspar.	Urée	Sulf. Am.	Glycose	Ac. succ.	Ac. cit.	Ac. pyr.
Témoin	+	+	+	+	+	+	+	+
+ NaF 2dg...	+	0 ou ± et ret	0 ou ± et ret.	0 ou ± et ret.	+	0	0	0

Ret. = Retard.

Il est intéressant de noter que le fluorure de calcium n'est pas toxique pour les levures.

5. *Cinquième série d'expériences : action de vitamines et de substances diverses.* — A. *L'aneurine* à la dose de 2 mg. semble favoriser l'assimilation de l'acide succinique, de l'acide citrique, de l'acide pyruvique, de l'urée, du sulfate d'ammonium, et les zonations sont d'apparition plus précoce que sur un témoin. L'aneurine semble agir sur la décarboxylation du général (sauf de l'histidine, comme nous avons pu nous en assurer avec une autre souche de *Candida krusei*, assimilant l'histidine) et sur la carboxylation de l'ammoniaque. Ces résultats intéressants nécessitent une vérification rigoureuse par la méthode micromanométrique de Warburg. On peut d'ailleurs aussi envisager qu'une assimilation accrue des hexoses peut favoriser l'assimilation de l'urée et du sulfate d'ammonium, sans que l'aneurine intervienne directement dans la décarboxylation et la carboxylation de ces dernières substances.

Quoi qu'il en soit, au point de vue pratique, l'addition d'aneurine permettra toujours d'obtenir des auxanogrammes particulièrement nets, et en particulier de l'urée pour des levures dont on veut déterminer le genre ou l'espèce par cette méthode, et il semble que si pour la détermination des levures, l'auxanogramme de l'urée ne donne pas toujours des résultats précis, cela tient moins aux variations du pH, par le fait de l'assimilation de l'urée, qu'à l'insuffisance d'un facteur de croissance convenable.

B. *L'amide de l'acide nicotinique*, à la dose de 5 centigr. pour 20 cm³ de gélose glycosée-peptonée, présente :

— en l'absence de phosphates, une action plutôt inhibitrice sauf sur l'acide succinique ;

— en présence de phosphates, une action stimulante nette sur l'assimilation des substances azotées étudiées et de l'acide succinique ; cette action stimulante augmente avec la quantité de phosphates ajoutés.

C'est l'inverse de l'aneurine dont l'action paraît relativement indépendante de la quantité de phosphates additionnés au milieu.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° *Conclusions quant à la valeur des méthodes de diffusion en gélose pour l'étude de la physiologie des microorganismes :*

Elles présentent les avantages suivants :

— application très facile ;

— elles assurent une répartition dégressive de la substance diffusante et permettent d'étudier son action pour des concentrations très différentes sur une même préparation ;

— il n'y a pas de contact brusque des microorganismes avec un excès de substance dont on veut éprouver l'action ;

— les résultats sont visibles, photographiables, facilement comparables entre eux.

On doit faire les réserves suivantes à leur sujet :

— il est pratiquement impossible de partir d'un milieu gélosé absolument synthétique, en raison des impuretés qui continuent à être retenues par adsorption sur la gélose, et l'on ne saurait considérer comme négligeable l'intervention des oligoéléments pour l'interprétation des résultats. Il faut donc vérifier par un grand nombre d'expériences les résultats obtenus ;

— les méthodes de diffusion n'ont pas une valeur quantitative comparable à celle des méthodes de dilution, méthode néphélométrique, méthode micromanométrique de Warburg.

Sous ces dernières réserves, leur champ d'application demeure illimité.

2° Conclusion quant aux résultats obtenus.

Ils nous paraissent particulièrement intéressants quand ils se rapportent à l'action de diverses substances sur la desmolyse. On peut, par la méthode de Beijerinck voir et même photographier la respiration d'un microorganisme cellulaire, et étudier l'action d'une substance donnée sur cette respiration ; elle est un complément de la méthode micromanométrique de Warburg qui n'apprécie pas un développement cellulaire, mais mesure un dégagement de gaz carbonique ou une absorption d'oxygène, ces derniers éléments ne représentant que partiellement le devenir du substrat.

Une *première constatation* est qu'une même substance peut agir suivant sa concentration comme facteur de croissance ou comme inhibiteur ; c'est notamment le cas du fluorure de sodium, comme si, à de faibles concentrations, il libérait l'action diastasique de certaines entraves ; l'un des grands sujets de la physiologie moderne est l'étude du déclenchement et de la régulation des actions diastases et d'autres catalyseurs dans leurs rapports notamment avec les oligoéléments.

Un *second ordre de faits*, déjà bien établis par Schopfer, au cours d'expériences qui restent un modèle de précision, c'est le grand nombre de facteurs de croissance dont les uns sont des substances rencontrées normalement dans la nature, tandis que d'autres sont des facteurs tout à fait occasionnels, accidentels même, dont le méca-

nisme d'action n'est facile à établir que si elle s'exerce sur des organismes unicellulaires.

Un *troisième ordre de faits*, qui prouve bien l'intervention sur la régulation diastasique est l'action antibiotique de la lactoflavine à l'égard de certaines levures et d'un grand nombre de champignons.

Cette action anti-biotique est bien une action spécifique parce que sélective en s'exerçant pour un potentiel d'oxydo-réduction bien déterminé pour un *pH* donné ; et parce que sélective, elle montre ses effets déjà pour des concentrations minimales de l'ordre du 1/30.000^e par exemple.

Déjà, Wurmser avait établi l'importance des potentiels d'oxydo-réduction des systèmes biologiques.

Lutz, par la méthode des indicateurs colorés, a montré la valeur catalytique ou anti-catalytique de diverses substances, notamment des anti-oxygènes, chez des basidiomycètes.

Fildes, Hotchkiss pensaient que la pénicilline agissait comme un anti-catalytique sur la respiration des microorganismes.

La comparaison de la formule chimique de la pénicilline (Robinson) et de l'aneurine montre qu'elles présentent, l'une et l'autre, un groupement thiazolique, fragment thiazolique qui, transporteur d'électrons, vibre de l'état oxydé à l'état réduit dans la cocarboxylase.

D'autre part, il est des parentés chimiques entre la lactoflavine et d'autres substances chimiques électroactives et dont certaines présentent des leuco-dérivés : pyocyanine, chlororaphine, iodinine, dérivés anthraquinoniques, colorants thiaziniques, colorants oxaziniques.

Mais là ne s'arrêteront pas les résultats obtenus par les méthodes de Heatley et de Beijerinck ; elles pourront éclairer le problème de nombreux antagonismes ou synergies des organismes unicellulaires en en révélant la ou les causes, et fournir des données nouvelles sur la décarboxylation de l'histidine, sur des réactions biologiques ou humorales, sur l'action des antiseptiques, des toxiques vrais, des toxines, etc...

BIBLIOGRAPHIE

- COURTOIS. — Les facteurs de croissance de la levure. *Cycle des industries de fermentation, 1942-1943*. Editions de la Maison de la chimie.
- HEATLEY. — A method for assay of penicilline. *Biochemical Journal*, 1944, p. 61-69.
- KLUYVER. — The suitability of disaccharides as respiration and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars. *Antonie van Leeuwenhoek*, VI, 1939-40.

- LANGERON. — *Précis de mycologie*, Paris, Masson et Cie, 1945.
- *Précis de microscopie*, Paris, Masson et Cie, 6^e éd., 1942.
- LANGERON et GUERRA. — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Annales de parasitologie*, XVI, 1938, p. 164-172 et p. 506-507.
- Orientation de la filamentisation des champignons levuriformes cultivés sur lames gélosées. *Annales de parasitologie*, XVII, 1939-40, p. 580-589.
- LODDER. — *Die anaskosporegenen Hefen*, Amsterdam, 1934, 256 p.
- LUTERAAN et DENIS. — Application de la méthode auxanographique à l'étude des facteurs de croissance. *C.R. Soc. Biol.*, CXL, 1946, p. 131.
- De l'activité antibiotique de la lactoflavine à l'égard de certaines levures. *C.R. Soc. Biol.*, CXL, 1946, p. 294.
- LUTZ. — *Traité de cryptogamie*, Paris, Masson, et Cie, 1942, p. 121 et p. 394-396.
- POLONOVSKI. — *Eléments de biochimie médicale*, Paris, Masson et Cie, 1942.
- Glycolyse et respiration. *Exposés annuels de biochimie médicale*, Paris, Masson et Cie, 1944, 4^e série.
- POURBAIX. — Action des corps cancérigènes sur le métabolisme du glucose des tissus survivants ou des levures vivantes. *Actes de l'union internationale contre le cancer*, 1935, n° 1.
- SALVINIEN. — Dispersion protégée d'un corps insoluble dans un sol ou un gel de colloïde stable. *Thèse Faculté des sciences*, Paris, 1945.
- SANNIÉ. — Pigments et substances antibiotiques des champignons et des bactéries. *Exposés annuels de biochimie médicale*, Paris, Masson et Cie, 1946, 6^e série.
- SCHOPFER et YUNG. — Un test végétal pour l'aneurine. Méthode, critiques et résultats. *1^{er} Congrès international technique et chimique des industries agricoles*, Scheveningue.
- SCHOPFER et MOSER. — Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance des micro-organismes contenus dans le germe de blé. *Protoplasma*, XXVI, n° 4, 1936.
- WAKSMAN. — *Microbial antagonisms and antibiotic substances*. Commonwealth fund, New-York, 1945.
- WURMSER. — Les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes biologiques. *Exposés annuels de biochimie médicale*, 1^{re} série, Paris, Masson et Cie, 1939.

Institut de parasitologie de la Faculté de médecine de Paris

(Directeur : Prof. E. Brumpt)

Section de mycologie (chef de service : Dr Maurice Langeron).