L'IMMERSION DES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES DANS LES MILIEUX DE CULTURE SOLIDES

Par M. LANGERON et Ph. J. LUTERAAN

Si on ensemece un champignon levuriforme en en déposant un fragment minime à la surface d'un milieu gélosé nutritif, il y a développement végétatif en surface ; parfois, au bout d'un temps variable, le développement s'étend en profondeur dans le sein de la gélose. Ce phénomène, reconnu par Langeron et Talice (1932), a été dénommé par eux « *immersion dans les milieux de culture solides* » ; nous l'appellerons plus brièvement *immersion*.

Les circonstances d'apparition de l'immersion et ses caractères présentent des différences marquées chez les levures et les champignons filamenteux, ces derniers étant physiologiquement et morphologiquement plus différenciés.

I. — HISTORIQUE

En 1932, M. Langeron et R.-V. Talice écrivent (1932, p. 9) :

« Les cultures sur milieux solides, surtout les cultures géantes, prennent pour nous une signification très différente de celle qu'on leur accorde habituellement. Les caractères de surface et d'étendue passent au second plan : nous attachons bien plus d'importance au développement de l'appareil sporifère en profondeur. Il est vraiment remarquable qu'un appareil si délicat, si fragile, composé d'éléments si caducs, arrive à s'épanouir dans l'épaisseur de la gélose et à la traverser en tous sens, en parcourant des distances relativement considérables. Tout en cheminant ainsi dans la gélose, le mycélium développe ses bouquets caractéristiques de blastospores. »

Et plus loin (1932, p. 10) :

« L'étude des cultures sur milieux solides a révélé un autre fait, c'est l'apparition d'appareils sporifères dans la profondeur de la gélose, dans des conditions d'anaérobiose imparfaite qui rappellent tout à fait celles

ANN. DE PARASITOLOGIE, T. XXIV, N^{os} 1-2. — 1949, p. 143-179.

que le champignon rencontre dans les milieux liquides. Si l'on suit l'évolution d'un blastosporé ensemencé à la surface d'un tube ou d'une boîte de gélose glycosée, on assiste d'abord à une première phase de développement végétatif luxuriant, aboutissant à la production d'une couche crémeuse blanc-jaunâtre, formée de myriades de blastospores, entremêlées parfois de quelques ébauches de filaments. Le champignon se trouve dans un milieu aéré et plus ou moins riche en sucre, suivant la composition du mélange nutritif gélosé, en tout cas beaucoup plus riche que l'eau de pommes de terre. Mais, peu à peu, on voit apparaître, dans la profondeur, des filaments très fins qui s'allongent et rayonnent en tous sens. Si on examine ces filaments à la loupe, on voit que ce sont en réalité des appareils sporifères, portant des blastospores attachées d'une manière particulière et différente suivant les genres. A leur tour ces blastospores bourgeonnent et s'entassent autour du filament primitif qui est peu à peu masqué et finit par disparaître sous l'accumulation des blastospores qui le recouvrent comme un manchon... »

Enfin, page 7, ces lignes qui pourraient servir de conclusion :

« ...les filaments peuvent se développer aussi dans l'épaisseur des milieux solides, gélatinés ou gélosés, car ces organismes paraissent en général médiocrement aérobies. La plupart du temps, ils forment des dépôts au fond des tubes de milieux liquides et non des voiles superficiels. Sur les milieux solides, l'appareil filamenteux se développe dans la profondeur de la gélose, à l'abri de l'épaisse couche crémeuse formée par les blastospores ».

L'examen de ces colonies immergées en milieu solide est décrit page 13 dans les termes suivants :

« L'étude microscopique se fait par l'observation du développement en profondeur sur gélose glycosée en tubes inclinés..... Pour l'observation, on installe sur la platine du microscope deux gâteaux de cire à modeler sur lesquels on applique les extrémités du tube ; on peut ainsi donner à ce dernier l'orientation désirée. L'examen se fait avec un objectif moyen, associé à un oculaire puissant..... Un certain nombre de nos microphotographies ont été ainsi faites à travers le verre des tubes, ce qui montre qu'au point de vue optique ce mode d'examen ne laisse rien à désirer. »

Suit la description du prélèvement en profondeur de petits blocs de gélose qu'on étale dans une goutte de bleu-coton-soudan au lactophénol, à l'aide d'une douce chaleur et avec lesquels on obtient des préparations permanentes.

Nous pensons avoir été les premiers (Langeron et Talice) à signaler et à tenter d'expliquer le fait de l'immersion des colonies de

champignons levuriformes dans la gélose. Ce phénomène avait été aperçu et représenté avant nous par plusieurs observateurs, mais il ne semble pas qu'ils en aient saisi l'importance. C'est le cas de : Mlle Daïreuva (1899, pl. II, fig. 8, 9, 10, qui a même vu l'immersion dans le tissu de tranches de betterave, de carotte et de *Tricholoma rutilans*) ; Harter (1909, pl. IV, fig. 1 ; pl. III, fig. 6) ; Ch. du Bois (de Genève) (1910, pl. III, représentant toutes les phases du phénomène par d'admirables microphotographies) ; Pinoy (1911, qui n'a pas reconnu une levure et l'a prise pour un sporotriché, *Enantiothamnus brautii*) ; Motta (1926, notamment la fig. 4) ; F. W. Shaw (1930, étude de coupes à main levée de cultures par piqure en gélatine) ; R. W. Benham (1931, qui a vu immergés, pour *Candida albicans*, les verticilles de blastospores et les bouquets de chlamydo-spores), etc., etc...

L'interprétation proposée par Langeron et Talice (organismes paraissant en général médiocrement aérobies) n'était qu'un timide essai d'explication physiologique.

Ce rudiment a été repris et transformé au cours des expériences effectuées par Ph. J. Luteraan depuis 1946 (voir bibliographie). Etudiant les modifications des colonies géantes en tubes sous l'influence de milieux de culture favorisant la lipogénèse, il a constaté que les champignons levuriformes s'immergent constamment dans ces conditions. Ses travaux antérieurs, relatifs à l'action de l'oxygène sur la morphogénèse et sur la production de pigments mélaniques et caroténoïdes, s'étendent aussi à l'immersion des colonies de levures.

Cet ensemble d'expériences fournit ainsi une interprétation physiologique d'un phénomène dont on s'était borné jusqu'ici à constater l'existence. Il permet aussi d'établir : 1° que l'immersion chez les levures est un caractère de détermination d'une certaine valeur ; 2° qu'elle est une des manifestations relevant d'une fonction nouvelle et jusqu'ici méconnue, la *fonction antioxygène physiologique*.

II. — CIRCONSTANCES D'APPARITION

L'immersion est toujours secondaire à une phase de développement végétatif en surface. Elle apparaît soit précocement au bout de deux ou trois jours, soit plus tardivement au bout d'une ou même deux, trois semaines. Ceci dépend du genre ou de l'espèce de levure et de la composition du milieu employé. Par exemple, elle est précoce chez les *Candida* du groupe *albicans*, chez *Candida krusei*, chez

Candida lipolytica ; elle est tardive chez divers *Saccharomyces* étudiés, chez *Pichia membranæfaciens*, etc...

Elle peut être discrète ou devenir prédominante par rapport au développement en surface, elle est alors presque totale ; *mais elle est, même dans ce cas, associée à un développement végétatif en surface, si minime soit-il.*

Elle peut enfin être spontanée, c'est-à-dire s'observant sur des milieux de culture habituels, ou être provoquée expérimentalement ; on peut alors faire varier sa date d'apparition et son intensité.

Pour apprécier définitivement l'existence et le degré d'immersion spontanée, mieux vaut attendre plusieurs semaines. Le tableau suivant précise son existence et son degré chez divers champignons levuriformes, après culture pendant six semaines sur milieu gélosé à 2 p. 100, glycosé à 2 p. 100 et peptoné à 1 p. 100.

TABLEAU I

N° DES SOUCHES	DÉNOMINATION	IMMER- SION	FILAMENTI- SATION	POUVOIR FERMEN- TATIF
95.....	<i>Saccharomyces unisporus.</i>	0	0	+
96.....	<i>S. muciparis.</i>	++	+	+
97.....	<i>S. pastorianus.</i>	++	+	+
99.....	<i>S. octosporus.</i>	0	0	+
100.....	<i>Zygosaccharomyces priorianus</i>	0	0	+
147, 1.037	<i>Saccharomyces carlsbergensis.</i>	±	±	+
402.....	<i>S. cerevisiae annulatus.</i>	0	0	+
599.....	<i>Debaryomyces hudeloi.</i>	0	0	
603.....	<i>D. klöckeri.</i>	0	0	±
1.056.....	<i>D. matruchoti.</i>	0	0	0
127.....	<i>Hanseniaspora guilliermondi.</i>	++	+	+
121.....	<i>Hansenula saturnus.</i>	±	±	+
128.....	<i>Nematospora coryli.</i>	+++	+	+
1.038.....	<i>Pichia membranaefaciens.</i>	+++	+	0
123.....	<i>Schwanniomyces occidentalis.</i>	0	0	+
109.....	<i>Torulaspora delbrucki.</i>	0	0	+
129.....	<i>Endomycopsis fibuliger.</i>	++	+	+
130.....	<i>E. vernalis,</i>	+++	+	0
131.....	<i>E. capsularis.</i>	+++	+	±
103.....	<i>Torulopsis laurentii.</i>	0	0	0

N° DES SOUCHES	DÉNOMINATION	IMMER- SION	FILAMENTI- SATION	POUVOIR FERMEN- TATIF
104.....	<i>T. utilis.</i>	±	±	+
105.....	<i>T. lipofera.</i>	0	0	0
106.....	<i>T. molischiana.</i>	0	0	+
107.	<i>T. flavescens.</i>	0	0	0
108.....	<i>T. albida.</i>	0	0	0
108.....	<i>T. pulcherrima.</i>	0	0	±
111, 118..	<i>Candida albicans.</i>	+++	+	+
753, 295 V	<i>C. triadis.</i>	+++	+	+
60.....	<i>C. stellatoidea</i>	+++	+	+
148.....	<i>C. truncata.</i>	+++	+	+
518.....	<i>C. tropicalis.</i>	+++	+	+
110.....	<i>C. intermedia.</i>	0	+	+
115.....	<i>C. pelliculosa.</i>	0	0	+
58, 1.049.	<i>C. pseudo-tropicalis</i> (= <i>Saccharomyces fragilis</i>).	++	+	+
41, 42, 54	<i>C. guilliermondi.</i>	±	+	+
117.....	<i>C. macedoniensis</i> (= <i>Saccharomyces marxianus</i>).	±	+	+
1.046, 1.039A	<i>C. krusei.</i>	+++	+	+
198.....	<i>C. parakrusei.</i>	+++	+	+
114.....	<i>C. reukaufi.</i>	±	+	±
119.....	<i>C. brumpti.</i>	+	+	±
112.....	<i>C. lipolytica.</i>	+++	+	0
113.....	<i>C. zeylanoides.</i>	++	+	0
126.....	<i>Mycoderma vini.</i>	±	±	0
81.....	<i>Rhodotorula bronchialis.</i>	+	+	0
	<i>Geotrichoides cutaneus.</i>	+++	+	0
	<i>Geotrichum candidum.</i>	+++	+	0

Filamentisation 0 signifie qu'elle n'existe pas ou qu'elle n'est pas apparente macroscopiquement.

L'examen de ce tableau entraîne les remarques suivantes :

1° L'immersion est toujours liée à une filamentisation ; la réciproque est moins constante, du moins en ce qui concerne l'immersion spontanée. On reconnaît facilement une filamentisation à l'examen avec une loupe de fort grossissement (X 12 ou X 16). Rappelons que la filamentisation est liée à l'allongement d'éléments blastosporés, formant un pseudo-mycélium avec constitution soit d'un appareil

blastosporé verticillé, soit de chaînettes de blastospores allongées, soit de chaînettes de pseudo-conidies (Langeron et Talice, 1932).

2° L'appréciation d'un appareil blastosporé verticillé est particulièrement aisée avec une loupe puissante (X 12 à X 16). Les blastospores peuvent ne pas être différenciées en éléments pseudo-mycéliens, elles sont alors simplement disposées en chaînettes plus ou moins régulières (pseudo-filamentisation).

En règle générale, chez les Rhodotorulacées, les *Torulopsis*, les *Mycoderma*, la filamentisation fait défaut et ces levures ne s'immergent qu'exceptionnellement. La possibilité de s'immerger est donc liée chez les levures à la capacité de filamentisation ou de pseudo-filamentisation qui a été reconnue, en culture sur lames, chez des *Debaryomyces* (Langeron et Guerra, 1941), des *Pichia* (Langeron et Luteraan), des *Saccharomyces*, etc... Lorsque les blastospores ne forment que des chaînettes, l'immersion est toujours plus tardive qu'en cas de filamentisation avec pseudo-mycélium.

III. — ETUDE EXPERIMENTALE DE L'IMMERSION CHEZ LES LEVURES

La capacité d'immersion est, nous l'avons vu, un caractère de genre et même d'espèce ; mais sa date d'apparition, son intensité et son aspect dépendent également d'autres facteurs, dont il convient de préciser la nature et l'influence. Tout d'abord, il faut déterminer si les éléments immergés plus ou moins profondément dans la gélose se trouvent effectivement placés en anaérobiose et confirmer expérimentalement que l'immersion n'est possible que chez des levures se développant en présence d'oxygène.

A. — Action de l'oxygène. — Le développement des éléments immergés a-t-il lieu ou non en anaérobiose ? Telle est la première question posée.

1° *Rhodotorula bronchialis* (souche 81) peut s'immerger, ce qui constitue une exception chez les Rhodotorulacées (J. Méry) ; mais au niveau des éléments immergés, il n'y a pas apparition de pigments caroténoïdes visibles ; l'existence d'une pigmentation cesse brutalement au point où il y a pénétration dans la gélose. Or, les pigments caroténoïdes ne se forment qu'en présence d'oxygène chez les Rhodotorulacées, comme il sera démontré ultérieurement.

2° Pour éviter la pénétration d'oxygène dans le milieu de culture,

on laisse refroidir dans l'autoclave fermé de la gélose stérilisée *en culot*. On dépose ensuite à la surface du milieu, *sans piquer la surface gélosée*, un fragment minime de champignon. On lit au bout d'une semaine les résultats obtenus.

TABLEAU II

SOUCHES	GÉLOSE LAVÉE 3 P. 100 ET GLYCOSE PUR 2 P. 100		GÉLOSE BRUTE 2 P. 100 ET SACCHAROSE 7,5 P. 100	
	Croissance	Immersion	Croissance	Immersion
<i>Candida lipolytica</i> .	+	++	+	+
<i>C. albicans</i>	+	++	+	++
<i>C. krusei</i>	+	++	+	++

Mais si on ensemence la gélose en culot par dilution au lieu de l'ensemencer en surface, on constate qu'il n'y a pas formation de colonies isolées dans le sein de la gélose et *à fortiori* de filamentisation ; le développement des levures dans le sein de la gélose paraît être nul ; c'est le contraire pour les bactéries anaérobies qui, dans les mêmes conditions, donnent des colonies souvent caractéristiques et qui fragmentent la gélose.

Ces expériences suffisent à indiquer que les éléments immergés, s'ils ne se développent peut-être pas en anaérobiose absolue, se trouvent être en présence d'une tension en oxygène très minime qu'il n'est pas autrement possible de préciser, en raison de l'absence de techniques de dosage direct de l'oxygène.

On aborde ainsi la seconde question, tout aussi importante que la première, et qui est la suivante : L'immersion n'est-elle observée que chez les levures se développant en aérobiose ?

1° L'expérience rapportée ci-dessus se trouve confirmée dans ses résultats par le fait que, dans les tubes de fermentation, le développement cellulaire est faible et qu'on ne trouve pas de filamentisation au niveau des éléments prélevés. Les expériences anciennes de Denys Cochin, de H. T. Brown ont démontré depuis longtemps le rôle catalytique de l'oxygène sur la multiplication cellulaire et sur la croissance des levures.

2° Une constatation qui se rapproche des précédentes est la sui-

vante : si on prélève un fragment de voile muqueux, récemment formé à la surface d'un milieu liquide contenu dans un tube 18×18 et ensemencé avec une levure à voile, telle *Candida krusei*, *Pichia membranæfaciens*, etc..., on trouve des éléments cellulaires arrondis ou ovalaires, bourgeonnants, avec une capsule importante, par laquelle ils sont coalescents, contenant du glycogène en abondance, mais sans enclaves lipidiques ; il n'y a pas de filamentisation. Ces cellules, provenant récemment du milieu liquide où la tension en oxygène est forcément très réduite, ne présentent ni filamentisation, ni même une ébauche de cette dernière.

L'immersion, qui est liée à la filamentisation, ne peut donc se produire que chez des levures se développant en aérobiose. Le fait que le développement végétatif en surface précède constamment l'immersion laissait déjà présumer que l'oxygène intervenait indirectement dans la production de ce phénomène si important.

Une autre expérience donne des résultats en apparence contradictoires avec les précédents. On ensemence sur gélose inclinée l'une des souches précédentes, puis on emplit à la seringue le tube sur toute la hauteur de la gélose avec de l'huile de paraffine stérile. On observe, malgré la tension en oxygène forcément diminuée, mais encore notable, un développement marqué en surface, suivi d'immersion ; le fait est patent, surtout avec *Candida krusei*, levure zymatique, et *Candida lipolytica*, levure azymatique. Cette expérience indique qu'une tension en oxygène faible est suffisante pour assurer le développement de ces levures et leur filamentisation. Ces levures sont, comme tous les champignons, des organismes aérobies, mais elles sont médiocrement aérobies ou plus exactement, comme il sera démontré ultérieurement, ce sont des organismes à potentiel d'oxydo-réduction cellulaire peu élevé en aérobiose.

B. — Influence de la composition, de la concentration et de la réaction du milieu de culture. — La méthode suivie est simple : on fait varier l'élément ternaire ou l'élément azoté du milieu de culture, en modifiant la concentration de l'un ou de l'autre. On agit sur la réaction du milieu en employant soit les nitrates, dont l'assimilation entraîne une alcalinisation relative, soit certains sels d'ammonium, l'assimilation élective ou exclusive de l'ion ammonium déterminant une acidification progressive du milieu.

Les observations ont été faites sur un nombre relativement important de souches et nous exposerons d'abord les résultats globaux.

1. Résultats globaux. — Sauf indications contraires, les milieux sont calqués sur le milieu peptoné à 1 p. 100, gélosé et glycosé (dex-

trosé) à 2 p. 100, c'est-à-dire qu'ils contiennent 1 p. 100 de substance azotée et 2 p. 100 de substance ternaire. Ils sont stérilisés suivant la méthode de Sabouraud-Langeron. La gélose est inclinée avec précaution pour éviter au maximum la dissolution d'air dans le milieu. L'ensemencement est fait par points, *en évitant bien entendu de piquer la surface de la gélose.*

Les résultats globaux sont indiqués souche par souche.

SACCHAROMYCES UNISPORUS (95)

Sur *succinate d'ammonium-dextrose* (ce qui signifie 1 p. 100 de succinate d'ammonium et 2 p. 100 de dextrose, milieu gélosé à 2 p. 100), le développement est très faible.

Sur *succinate d'ammonium-glycérol*, il est nul.

SOUCHE 98 (1)

Les résultats suivants sont obtenus au bout d'un mois :

TABLEAU III

GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI-SATION	OBSERVATIONS
Saccharosé à 2 p. 100..	+	+	±	Pigmentation superficielle et centrale
Saccharosé à 7,5 p. 100.	+	++	±	<i>id.</i>
Saccharosé à 2 p. 100 et peptoné à 1 p. 100....	+++	0	0	Pigmentation nulle
Saccharosé à 7,5 p. 100 et peptoné à 1 p. 100..	+++	0	0	<i>id.</i>

Chez cette souche, ferment puissant, même en présence d'air et tant à l'égard du saccharose qu'à l'égard du glucose, comme nous avons pu le constater, l'immersion est toujours modérée et tardive. La pigmentation au niveau de la colonie superficielle, et qui n'apparaît que sur milieu déficient en azote (gélose brute ne contenant que des traces d'azote), est liée à la présence d'enclaves lipidiques impor-

(1) Levure anascosporée, faisant fermenter : glycose, saccharose, maltose, raffinose ; assimilant : asparagine, histidine, urée, sulfate d'ammonium, nitrate de potassium. Colonie mates. Voile précoce. En somme, c'est un *Hansenula anascosporé*. Nous l'avons identifiée comme *Candida pelliculosa*.

tantes (examen histochimique avec le lactophénol-bleu coton-soudan III de Langeron).

L'immersion s'accompagne de filamentisation.

Enfin, on note ce fait fondamental et constant, à savoir *qu'il y a antagonisme entre croissance et immersion. Plus l'immersion sera accentuée, plus la croissance globale sera lente et faible.*

SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS (99)

Levure arthrosporée, dont la croissance lente tend à se faire en épaisseur. Elle est également osmophile. Elle n'assimile ni le saccharose, ni le glycérol, comme l'indiquent les observations suivantes :

milieu au *nitrate d'ammonium-saccharose* : croissance très faible.

milieu au *succinate d'ammonium-glycérol* : croissance nulle.

Ici, même en modifiant la nature de la source azotée, on ne constate aucune modification du pouvoir d'assimilation à l'égard du saccharose et du glycérol. Nous verrons qu'avec d'autres levures, on peut obtenir une *assimilation adaptative*, absente dans les conditions normales, et selon les données de la méthode auxanographique de Beijerinck.

SACCHAROMYCES MUCIPARIS (96)

Levure haute, qui fait fermenter glycose, saccharose, raffinose pour un tiers, dont la croissance est pauvre sur milieu à l'alcool de Stelling-Dekker et qui filamente.

Milieux au dextrose (2 p. 100) : avec *succinate d'ammonium* (1 p. 100) : bonne croissance superficielle : immersion, filamentisation en chaînettes ; avec *sulfate d'ammonium* : croissance uniquement superficielle et faible, avec forte pigmentation.

Milieu au saccharose : avec *sulfate d'ammonium* : croissance uniquement superficielle et faible, avec forte pigmentation.

Milieux au maltose : avec *sulfate d'ammonium* : croissance uniquement superficielle et faible avec filamentisation en surface ; pas de pigmentation.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance uniquement superficielle et faible.

Milieux au glycérol : avec *succinate d'ammonium* : croissance superficielle et faible ; immersion douteuse.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance faible ; immersion large avec filamentisation étalée.

Milieu à l'alcool : avec *nitrate d'ammonium* : croissance à peu près nulle.

Milieu au lactose : avec *nitrate d'ammonium* : croissance à peu près nulle.

Milieu polysucré LL (1) (Langeron et Luteraan)

Dextrine	}	à à 2 gr. 5
Saccharose		
Lactose		
Glycérol		
Nitrate de potassium	}	à à 2 gr. 5
Succinate d'ammonium		
Gélose		10 gr.
Phosphate bipotassique		1 gr.
Eau		500 cm ³

L'assimilation du nitrate de potassium provoque une alcalinisation progressive du milieu ; celle du succinate d'ammonium, une acidification progressive.

Ce milieu convient parfaitement aux levures dont il développe la morphologie caractéristique. Dans certains cas, l'adjonction de 1 p. 1.000 de caséine donne un résultat encore meilleur, en augmentant le rapport du développement en surface au développement en profondeur.

Milieu polysucré LL : bonne croissance ; en surface, colonie crémeuse, présentant quelques plis rayonnants ; immersion avec filamentisation.

SACCHAROMYCES FRAGILIS (58)

Cette levure fait fermenter le glycose, le saccharose, le *lactose*, le raffinose pour un tiers ; elle n'assimile pas le maltose ; elle assimile les sels d'ammonium, mais non le nitrate de potassium.

Ici, apparaît nettement l'influence de la nature de la substance azotée sur la croissance, sur l'assimilation des différents sucres, sur l'immersion.

Milieux au dextrose : avec *succinate d'ammonium* : croissance superficielle faible avec colonie crémeuse, irrégulière, lobée ; immersion légère.

— avec *succinate d'ammonium* : croissance nulle.

(1) M. Baeza a déjà proposé en 1936 (*in* Langeron et Baeza, 1936) un milieu polysucré, à base de glycose, maltose, dextrine.

Milieu au saccharose : avec *sulfate d'ammonium*: croissance faible ; colonie pigmentée ; immersion nette, mais sans filamentisation apparente.

On obtient les résultats expérimentaux suivants :

TABLEAU IV

GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI- SATION	PIGMENTA- TION
Saccharosée à 2 p. 100.....	+	+	+	0
Saccharosée à 7,5 p. 100.....	+	++	++	0
Saccharosée à 2 p. 100. et peptonée à 1 p. 100.....	+++	++	0	+
Saccharosée à 7,5 p. 100 et peptonée à 1 p. 100.....	++	0	0	++

Lorsqu'il y a déficience en azote, l'immersion augmente avec la concentration en glycidés ; lorsqu'il y a équilibre azoté, l'immersion diminue avec une augmentation de la concentration en glycidés. Cette règle s'est avérée jusqu'ici sans exception.

TABLEAU V

A. GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100 ET NITRATE NH_4 A 1 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI- SATION APPARENTE	PIGMENTA- TION
Saccharosée à 4 p. 100.....	+	±	0	+++
Saccharosée à 10 p. 100.....	+	++	0	++
B. GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100 ET NITRATE K A 1. 100				
Saccharosée à 4 p. 100.....	+	++	++	+
Saccharosée à 10 p. 100.	+	+++	+++	+

En présence de nitrates, et surtout de nitrate de potassium non assimilable, l'immersion augmente avec la concentration en saccharose. On remarque qu'en présence de nitrate de potassium, l'immer-

sion est presque totale, le développement en surface est réduit à quelques filaments superficiels.

Milieux au maltose : avec *sulfate d'ammonium* : développement nul.
— avec *nitrate d'ammonium* : développement très faible ; petite colonie crémeuse ; immersion très légère.

Milieux au glycérol : avec *succinate d'ammonium* : développement superficiel et très faible.

— avec *sulfate d'ammonium* : développement nul.

— avec *nitrate d'ammonium* : développement nul.

Le développement de tous les SACCHAROMYCES étudiés s'est révélé nul ou très faible en présence de glycérol.

Milieu à l'alcool : avec *nitrate d'ammonium* : croissance faible ; colonie blanche, crémeuse ; pas d'immersion.

Milieu polysucré LL : bon développement superficiel avec colonie blanche crémeuse, entourée d'une auréole de filaments superficiels ; immersion nette.

L'influence de la nature de la substance azotée sur l'assimilation des substances ternaires, comme celle des substances ternaires sur l'assimilation des substances azotées, est encore facilement mise en évidence par la méthode auxanographique de Beijerinck ; elle se manifeste par des différences dans la date d'apparition et dans l'intensité des zonations, qui traduisent la croissance du microorganisme étudié. A cet égard, on peut considérer la méthode de Beijerinck comme une méthode néphélométrique, appliquée à l'étude de la croissance sur milieux solides.

SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS (1.037)

Levure basse, appelée encore *levure de fermentation*, par opposition aux *levures hautes*, appelées encore *levures de respiration*.

Cette levure, à très fort pouvoir fermentatif, ne s'immerge pas ; des milieux provoquant habituellement l'immersion (*nitrate d'ammonium-saccharose* et *succinate d'ammonium-glycérol*) inhibent sa croissance.

SACCHAROMYCES CEREVISIÆ (402)

La croissance est nulle sur milieu *succinate d'ammonium-glycérol*.

ZYGOSACCHAROMYCES PRIORIANUS (100)

Levure osmophile, supportant des concentrations en sucre considérables. Sur *succinate d'ammonium-dextrose*, sa croissance est uniquement superficielle et faible.

TABLEAU VI

GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100	CROIS- SANCE	IMMER- SION	FILAMEN- TISATION apparente	PIGMENTATION
Saccharosée à 2 p. 100....	±	±	±	superficielle et centrale
Saccharosée à 7,5 p. 100...	±	±	±	<i>id.</i>
Saccharosée à 2 p. 100 et peptonée à 1 p. 100....	+++	±	0	O. Colonie un peu membra- neuse
Saccharosée à 7,5 p. 100 et peptonée à 1 p. 100...	+++	0	0	O. Colonie membraneuse

DEBARYOMYCES HUDELOI (599)

Levure faiblement zymatique, n'assimilant pas les nitrates et présentant une bonne croissance sur milieu à l'alcool de Stelling-Dekker.

Milieu succinate d'ammonium-glycérol : croissance moyenne et lente ; colonie blanche, crémeuse, bombée, plissée au centre ; immersion tardive, légère, mais nette.

Milieu polysucré LL : croissance moyenne, uniquement superficielle ; la colonie est partie membraneuse, partie crémeuse.

HANSENULA SATURNUS (121)

Ferment puissant, assimilant les nitrates et l'alcool.

Milieu succinate d'ammonium-glycérol : très bonne croissance, la colonie crémeuse au centre est lisse et mate à la périphérie.

Parmi les levures étudiées, *toutes celles qui présentent une bonne croissance en alcool assimilent également le glycérol.* Indépendamment de l'intérêt que présente cette constatation au point de vue physiologique, elle a l'avantage de faciliter la détermination des genres ou même de l'espèce.

Milieu de Czapek-Dox (*nitrate de potassium-saccharose*) : bonne croissance ; la colonie membraneuse est déprimée en son centre ; pas d'immersion.

Nous pensons signaler pour la première fois que *toutes les levures assimilant les nitrates assimilent également le saccharose, et que toutes ces levures présentent une bonne croissance sur milieu de Czapek-Dox.*

Milieu polysucré LL : bonne croissance ; colonie crémeuse et lisse ; pas d'immersion.

On observe, avec cette levure, *tous les intermédiaires entre les colonies rugueuses et lisses, avec passage facile d'un type à l'autre*, ce qui confirme les résultats expérimentaux de Langeron et Guerra qui démontrent la généralité de ce fait (Langeron et Guerra, 1941).

PICHIA MEMBRANÆFACIENS (143)

Levure azymatique, assimilant l'alcool et non les nitrates, et qui filamente.

Milieus au dextrose : avec *succinate d'ammonium* : bonne croissance ; colonie large, lobée et denticulée ; ni immersion, ni filamentisation apparente.

— avec *sulfate d'ammonium* : bonne croissance ; colonie jaunâtre à centre membraneux, à périphérie constituée par une zone crémeuse et une plus externe pseudo-filamenteuse avec contours lobés et irréguliers ; immersion nette.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonies pigmentées, mates, à contours lobés ; immersion nette.

Milieus au saccharose : avec *succinate d'ammonium* : développement superficiel et très faible.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance faible ; colonie crémeuse avec filamentisation en surface ; pas d'immersion.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance faible ; colonie crémeuse à contours lobés et mats avec filamentisation en surface ; pas d'immersion.

Milieus au maltose : avec *sulfate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie mince, mate, zonnée, à contours lobés ; l'aspect est celui d'un voile muqueux posé à la surface de la gélose ; pas d'immersion.

— avec *nitrate d'ammonium* : même aspect que précédemment.

Milieus au glycérol : avec *succinate d'ammonium* : bonne croissance ; colonie blanche, mate, un peu bombée, à contours lobés ; pas d'immersion.

— avec *nitrate d'ammonium* : mêmes caractères généraux que précédemment ; les colonies comportent des parties crémeuses et lisses.

Milieux à l'alcool : avec *nitrate d'ammonium* : bonne croissance ; colonies membraneuses au centre à contours lobés et denticulés ; immersion nette.

Milieu au lactose : avec *nitrate d'ammonium* : croissance très faible. Pratiquement cette levure n'assimile que le dextrose et le maltose comme sucres.

Milieu polysucré LL : très bonne croissance ; aspect de voile membraneux posé à la surface de la gélose ; tendance à l'immersion.

SCHWANNIOMYCES OCCIDENTALIS (123)

Levure zymatique faisant fermenter glycose et saccharose ; elle n'assimile pas le nitrate de potassium ; croissance faible en alcool.

Milieu nitrate d'ammonium-saccharose : croissance très faible.

Milieu succinate d'ammonium-glycérol : croissance faible ; les colonies blanches peuvent être coulantes ; pas d'immersion.

Milieu polysucré LL : croissance moyenne ; colonie arrondie, crémeuse et bombée en son centre ; pas d'immersion.

TORULASPORA DELBRUCKI (109)

Sur milieu *succinate d'ammonium-dextrose*, croissance moyenne ; colonie arrondie, blanche et crémeuse ; pas d'immersion.

Sur milieu *nitrate d'ammonium-saccharose*, croissance très faible.

TORULOPSIS UTILIS (104)

Ferment puissant, cette levure assimile le nitrate de potassium.

Milieu succinate d'ammonium-dextrose : croissance moyenne ; colonie blanche, crémeuse, arrondie ; pas d'immersion.

Milieu sulfate d'ammonium-dextrose : croissance médiocre ; colonie blanche, crémeuse, arrondie, pigmentée en son centre ; immersion tardive, mais nette, liée à une pseudo-flamentisation.

Milieu de Czapek-Dox : très bonne croissance ; colonie arrondie, légèrement zonée, blanche, crémeuse, cupuliforme en son centre ; immersion très légère et très tardive.

TORULOPSIS LIPOFERA (105)

Levure azymatique qui assimile glycose, saccharose, maltose, lactose, sulfate d'ammonium, mais non les nitrates ; mauvaise croissance en milieu à l'alcool de Stelling-Dekker.

Milieux au nitrate d'ammonium : avec *dextrose* : croissance médiocre. colonie blanche, crémeuse, coulante ; pas d'immersion.

— avec *maltose* : croissance faible ; colonie ayant les mêmes caractères que précédemment ; pas d'immersion.

— avec *lactose* : croissance faible ; colonie non coulante ; pas d'immersion.

— avec *glycérol* : croissance à peu près nulle.

— avec *alcool éthylique* : croissance à peu près nulle.

La croissance en milieu à l'alcool ou au glycérol est indépendante de l'existence ou non d'un pouvoir fermentatif chez une levure donnée.

TORULOPSIS MOLISCHIANA (106)

Levure ne faisant fermenter que le glycose et n'assimilant comme élément azoté habituel que la peptone (fait exceptionnel).

Milieux au dextrose : avec *succinate d'ammonium* : croissance à peu près nulle.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance à peu près nulle.

Nous avons constaté que les acides succinique, lactique, citrique, pyruvique étaient constamment assimilables par les levures. Dans le cas présent, il en est de même ; l'inhibition de la croissance ne peut être interprétée que comme liée à une action relativement toxique de l'ion ammonium libéré, comme en témoigne une action identique obtenue en présence de sulfate d'ammonium.

Une constatation du même genre a déjà été faite pour certaines des souches étudiées avec le nitrate d'ammonium, l'ion nitrique libéré paraissant exercer une action toxique, non simplement par acidification progressive du milieu.

CANDIDA ALBICANS (118)

Levure faisant fermenter glycose et maltose, assimilant le saccharose et les sels d'ammonium.

Milieux au dextrose : avec *succinate d'ammonium* : croissance très moyenne ; colonie légèrement pigmentée avec quelques îlots périphériques ; forte immersion avec filamentisation profonde compacte et étendue.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance faible ; développement en surface très réduit ; forte immersion avec filamentisation profonde étendue.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie petite avec quelques ilots périphériques ; forte immersion avec filamentisation profonde étendue.

Milieux au saccharose : avec *succinate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie avec ilots périphériques ; très forte immersion avec filamentisation profonde sous forme de gros cordons et très étendue.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance médiocre ; colonie légèrement pigmentée ; forte immersion avec filamentisation profonde étendue.

On obtient les résultats suivants :

TABLEAU VII

GÉLOSE BRUTE A 2 P. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI- SATION APPARENTE	DÉVELOP- PEMENT EN SURFACE
Saccharosée à 2 p. 100	+	++	++	±
Saccharosée à 7,5 p. 100	+	++++	++	±
Saccharosée à 2 p. 100 et peptonée à 1 p. 100	++	++++	0	++++
Saccharosée à 7,5 p. 100 et peptonée à 1 p. 100	++	++	0	+++++
peptone 1 p. 100	+	+	0	++

Milieux au maltose : avec *sulfate d'ammonium* : bonne croissance ; colonie crémeuse ; très forte immersion avec filamentisation profonde étendue et compacte.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie crémeuse avec quelques filaments superficiels ; très forte immersion avec filamentisation compacte.

Milieux au glycérol : avec *succinate d'ammonium* : croissance faible ; développement en surface très réduit ; forte immersion avec filamentisation profonde.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance médiocre ; colonie petite avec des filaments superficiels ; forte immersion avec filamentisation profonde et très étendue.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance faible ; colonie presque réduite à quelques filaments superficiels ; forte immersion avec filamentisation profonde, très étendue et compacte.

Milieu à l'alcool : avec *nitrate d'ammonium* : croissance médiocre ; colonie pigmentée (très tardivement verte ainsi que sur milieu nitrate d'ammonium-dextrose) avec filamentisation superficielle ; forte immersion.

Milieu au lactose : avec *nitrate d'ammonium* : croissance médiocre ; colonie réduite à quelques filaments superficiels ; immersion très forte.

*L'immersion quasi-totale est une constatation banale lorsqu'on cultive une levure, en présence d'un sucre qu'elle n'assimile pas, d'après les résultats de la méthode de Beijerinck. On trouve, au niveau des éléments immergés que l'on prélève, d'énormes enclaves lipidiques. A cette immersion quasi-totale et cette synthèse de lipides, correspond ce que nous avons dénommé « assimilation anaérobie » des sucres, par opposition à l'assimilation aérobie (résultats de la méthode de Beijerinck) et à la fermentation. D'autres exemples en seront donnés à propos de *Candida lipolytica* et de *Candida krusei*.*

Milieu au sulforicinate d'ammonium à 2 p. 100 : croissance médiocre ; développement insignifiant en surface ; développement important en profondeur.

Milieu polysucré LL : très bonne croissance ; colonie arrondie, bombée, crémeuse, entourée par une large zone de filamentisation surtout profonde.

CANDIDA INTERMEDIA (110)

Milieu sulfate d'ammonium-dextrose : croissance moyenne et lente ; colonie arrondie, crémeuse, pigmentée en son centre ; immersion légère et tardive.

Milieu polysucré LL : assez bonne croissance ; colonie crémeuse et rosée ; immersion nette.

CANDIDA PELLICULOSA (115)

Milieu sulfate d'ammonium-dextrose : croissance moyenne ; colonie blanche, crémeuse, à aspect zoné ; immersion légère et tardive.

CANDIDA REUKAUF (114)

Cette souche ne se développe pas sur milieu dont la source azotée est représentée par le nitrate d'ammonium.

CANDIDA BRUMPTI (119)

Cette souche, pratiquement azymatique, n'assimile pas le saccharose.

Milieu nitrate d'ammonium-saccharose : croissance très faible ; colonie irrégulière, légèrement plissée, à contours saillants.

Milieu succinate d'ammonium-glycérol : croissance faible ; pas d'immersion.

CANDIDA LIPOLYTICA (112)

Levure azymatique n'assimilant que le glycose. Cette levure présente cette particularité, non encore reconnue, de pouvoir se développer en présence de faible teneur en oxygène, presque en anaérobiose, bien qu'elle soit azymatique. On ne peut cependant pas dire qu'elle soit microaérophile, car elle se développe aussi bien lorsque la tension en oxygène est normale. Il est à remarquer que le développement de *Candida albicans*, qui est pourtant une levure zymatique, est vite inhibé pour de très faibles tensions en oxygène. Cette levure (*Candida lipolytica*) possède encore d'autres propriétés singulières, reconnues par Langeron et Guerra : celles de coaguler le lait et de liquéfier la gélatine rapidement. D'autres particularités nouvelles ont pu être mises en évidence par nous au sujet de cette levure si intéressante (voir page 170).

Milieus au dextrose : avec *succinate d'ammonium* : bonne croissance ; colonie avec zone assez large de filamentisation superficielle ; immersion nette avec filamentisation profonde.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie pigmentée avec filamentisation superficielle ; immersion très forte avec filamentisation profonde développée.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance moyenne ; faible filamentisation en surface ; immersion très forte.

On obtient les résultats suivants :

TABLEAU VIII

GÉLOSE BRUTE 2 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI-SATIO	DÉVELOPPEMENT EN SURFACE
Avec glycose pur 2 p. 100.	++	+++++	+++++	±
Avec glycose pur 7,5 p. 100.	++	+++++	+++++	±
Avec glycose pur 2 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	++++	+++	+++	+++ et pigmen- tation
Avec glycose pur 7,5 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	++++	++	++	id.
Avec peptone 1 p. 100....	++	++	+	+++

Milieux au saccharose: avec *succinate d'ammonium*: croissance médiocre ; presque rien en surface ; immersion très nette, quasi-totale.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance médiocre ; très petite colonie avec filamentisation superficielle prononcée ; forte immersion avec filamentisation profonde importante.

Dans le cas du saccharose, comme dans les cas suivants du lactose et du maltose, l'immersion quasi-totale en présence d'un sucre non assimilable par cette levure correspond au processus dénommé *assimilation anaérobie*, aboutissant principalement à une lipogénèse importante.

Milieux au maltose: avec *sulfate d'ammonium*: croissance médiocre ; quelques filaments superficiels ; immersion quasi-totale.

— avec *nitrate d'ammonium* : croissance médiocre ; filamentisation superficielle importante ; immersion prononcée.

Milieux au glycérol: avec *succinate d'ammonium*: croissance moyenne ; colonie un peu pigmentée avec filamentisation superficielle ; immersion très forte et étendue.

— avec *sulfate d'ammonium* : croissance moyenne ; colonie plissée, membraneuse, un peu pigmentée ; forte immersion.

Milieu à l'alcool : avec *nitrate d'ammonium* : croissance médiocre ; colonie pigmentée ; filamentisation superficielle ; forte immersion liée à filamentisation profonde.

Milieu au lactose: avec *nitrate d'ammonium*: croissance faible ; développement superficiel réduit à quelques filaments ; forte immersion avec une auréole assez large de filaments profonds. Il y a immersion quasi-totale en présence d'un sucre non assimilable d'après la méthode de Beijerinck.

Milieu polysucré LL. — On fait l'expérience suivante :

TABLEAU IX

MILIEU	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI- SATION	DÉVELOP- PEMENT EN SURFACE
<i>Milieu L L.</i>	++	+++++	+++++	+
Avec aneurine 0 mg 2	++	+++++	+++++	+
Avec ac. pantothénique 0 mg 2.	++	+++++	+++++	+
Avec caséine 1 p. 1.000	+++	+++	+++	+++
Avec caséine 1 p. 500	+++++	++	++	+++++

En somme, l'adjonction de facteurs de croissance ne paraît pas modifier le rapport développement en surface/développement en profondeur ; *ce rapport augmente avec la concentration en azote du milieu*. Notons que dans les essais 4 et 5, on obtient les colonies caractéristiques de *Candida lipolytica* (*seu deformans*). Il est à remarquer qu'avec cette levure, on n'obtient jamais la disparition complète de la filamentisation en profondeur.

GEOTRICHUM CANDIDUM

Ancien *Oidium lactis*, c'est une Geotrichale (Langeron) purement arthrosporée et azymatique.

TABLEAU X

MILIEU GÉLOSE BRUË 2 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	DÉVELOP- PEMENT EN SURFACE	ZONATIONS
Avec saccharose 2 p. 100	+	+++++		0
Avec glycose pur 2 p. 100 ...	++	+++++		+++
Avec saccharose 7,5 p. 100 ...	+	+++++		++
Avec glycose pur 7,5 p. 100...	++	+++++		+++
Avec saccharose 2 p. 100 et peptone 1 p. 100	++	+++	++	++
Avec glycose pur 2 p. 100 et peptone 1 p. 100	+++	+++	++	++
Avec saccharose 7,5 p. 100 et et peptone 1 p. 100	++	++	+++	0
Avec glycose pur 7,5 p. 100 et peptone 1 p. 100	+++	++	+++ et pigments caroté- noïdes	0
Avec glycérol 2 p. 100 et nitrate NH ⁴ 1 p. 100	+	+++++		+++
Avec peptone 1 p. 100	+	++	++	+

La déficience en azote produit un effet analogue, au point de vue immersion, à celui qui est obtenu, avec d'autres levures, en présence d'un sucre non assimilable d'après la méthode de Beijerinck ; dans les deux cas, l'immersion est presque totale. Le fait est général. D'autre part, on constate qu'il y a, sur milieux déficients en azote

et sur milieux au glycérol principalement, production de zonations concentriques.

Dans ce qui précède, nous avons exposé des résultats globaux ; il devient possible en les confrontant de déduire l'action particulière de chaque facteur inhérent au milieu.

2. Action de chaque facteur particulier.

a. Influence de la nature de la source azotée. — *Le déséquilibre azoté est le facteur qui provoque le plus constamment l'immersion et la filamentisation chez les levures*, qu'il soit lié à une déficience en azote ou à un défaut ou retard d'assimilation de la substance azotée. A cet égard, on constate par la méthode de Beijerinck que l'assimilation de la peptone est la plus précoce ; viennent ensuite par ordre décroissant : asparagine et sulfate d'ammonium, urée et nitrate de potassium. Par l'emploi de cette méthode, nous avons pu constater que si la nature de l'aliment ternaire avait une influence sur la vitesse d'assimilation des substances azotées, la nature du substrat azoté en exerçait une plus importante sur celle des différentes substances ternaires.

L'action des nitrates se superpose à celle d'un déséquilibre azoté lorsque l'ion nitrique n'est pas assimilable, comme il a été constaté chez *Saccharomyces fragilis*.

Les sels d'ammonium, la tyrosine peuvent exercer une action particulière qui sera examinée (voir page 170).

b. Influence de la nature de la substance ternaire. — Les règles déjà formulées au cours du précédent paragraphe se sont trouvées constamment vérifiées : l'immersion augmente avec la concentration en glycides lorsqu'il y a déséquilibre azoté ; elle diminue avec elle lorsque le milieu est équilibré en azote.

L'immersion présente des rapports certains avec l'assimilation des glycides, comme le démontre l'expérience suivante (tableau XI). ceci avec toutes les réserves que comporte l'interprétation de résultats expérimentaux par l'emploi, *in vivo*, d'inhibiteurs de fermentation.

De façon générale, moins la substance ternaire est assimilable, plus l'immersion est développée. Dans cette forme d'*assimilation adaptative* qu'on appelle *assimilation anaérobie*, l'immersion est quasi-totale. En effet, *Candida krusei*, qui n'assimile pas le saccharose, présente, dans certaines conditions, une *assimilation adaptative* à l'égard de cette substance, comme en témoigne l'expérience suivante (tableau XII).

TABLEAU XI

Souches	MILIEU PEPTONE- GLYCOSE TÉMOIN		MILIEU PEPTONE- GLYCOSE NaF(1) A 1 p. 100	
	Développement		Développement	
	en surface	en profondeur	en surface	en profondeur
<i>Candida lipolytica</i>	+++	++	++ (en épais- seur)	+
<i>C. albicans</i>	+++	++	<i>id.</i>	+
<i>C. krusei</i>	+++	++	<i>id.</i>	0

TABLEAU XII

GÉLOSE BRUTE A 2 p. 100	CROISSANCE	IMMERSION	FILAMENTI- SATION	DÉVELOP- PEMENT EN SURFACE
Avec glycose pur 2 p. 100	+	++	++	+
Avec saccharose 2 p. 100		+	+	0
Avec glycose pur 7,5 p. 100...	+	+++	++	+
Avec saccharose 7,5 p. 100....	+	+++	++	0
Avec glycose pur 2 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	+++	+++	+	+++
Avec saccharose 2 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	+	+++ et plus précoce	++	+
Avec glycose pur 7,5 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	+++	0	0	++++
Avec saccharose 7,5 p. 100 et peptone 1 p. 100.....	++	+++	+++	+
Avec peptone 1 p. 100		0	0	++

Dans les expériences 1, 2, 3, 4, on trouve des enclaves lipidiques énormes ; dans l'expérience 8, les enclaves lipidiques sont moins

(1) Le fluorure de sodium entraîne un retard et une diminution de l'immersion par rapport au développement en surface dans les conditions de l'expérience.

nombreuses, mais on trouve beaucoup de cristaux dans le milieu de culture.

L'assimilation anaérobie correspond soit à un processus lipogénétique, soit plus rarement à d'autres synthèses.

L'assimilation anaérobie se présente non moins fréquemment avec des alcools (alcool éthylique, glycérol) et on trouve au niveau des éléments immergés des enclaves lipidiques importantes ; cette assimilation anaérobie ne peut être que liée à des processus de déshydrogénation.

c. Action de la pression osmotique. — L'augmentation de la concentration en glycides a, on l'a vu, un effet différent sur l'immersion, suivant qu'il y a ou non équilibre azoté.

L'augmentation de la concentration en substance azotée, facilement assimilable (peptone, caséine), tend à restreindre l'immersion.

En cas d'emploi de substances à petite molécule, l'augmentation de la pression osmotique est rapide, mais l'immersion se produit surtout dans le cas où ces substances ne sont pas assimilées aisément.

A l'action de la pression osmotique, se joint celle qu'exerce la substance par sa nature propre.

d. Déshydratation. — Un facteur plus constant est la *déshydratation*, qui agit comme une augmentation globale de la concentration du milieu nutritif et principalement en gélose ; elle est la plus marquée au niveau de la partie supérieure des tubes de gélose inclinée ; on observe, à hauteur des zones déshydratées, que la filamentation est abondante (Langeron et Guerra, 1938) et que l'immersion est particulièrement précoce et intense.

e. Action de la réaction du milieu. — Certains sels d'ammonium, par assimilation préférentielle de l'ion ammonium, provoquent une acidification progressive du milieu (sulfate, succinate, etc...) ; dans ces conditions, l'immersion est fréquente.

3. Rapports de l'immersion avec diverses activités physiologiques.

a. Avec la protéogénèse. — Sur des milieux de culture normaux et équilibrés (par exemple gélose glycosée à 2 p. 100 et peptonée à 1 p. 100 de Langeron et Milochevitch, 1930), il y a possibilité d'immersion spontanée chez certaines levures et, dans ce cas, il n'y a pas antagonisme entre croissance et immersion.

Il en va tout autrement lorsque l'immersion est provoquée expérimentalement ; en ce cas, plus l'immersion provoquée est forte,

plus la croissance est faible ; elle est très réduite lorsque l'immersion est presque totale.

b. *Avec la fermentation alcoolique.* — Il y a indépendance absolue entre l'existence d'un pouvoir fermentatif et la capacité d'immersion spontanée ou provoquée, comme l'indiquent les résultats figurés sur le tableau I.

C'est un fait paradoxal qu'une levure azymatique puisse se développer *pro parte* en anaérobiose tout au moins relative.

Il y a des différences morphologiques considérables entre les éléments levuriformes développés en anaérobiose et les éléments levuriformes immergés. Chez les premiers, on trouve une forme ovale ou régulièrement arrondie, les éléments sont nettement séparés. Chez les seconds, la différenciation morphologique est poussée à l'extrême : d'une part, les éléments cellulaires ne sont plus isolés et sont unis ; d'autre part, il y a dédifférenciation d'un pseudomycélium par allongement de blastospores, voire constitution d'un appareil blastosporé verticillé.

Chez des levures zymatiques elles-mêmes, on observe qu'un sucre non fermentescible pour ces levures, que l'alcool, le glycérol excrétés en anaérobiose provoquent, lorsque ces champignons se développent en aérobiose, l'immersion.

On a démontré (Béraud, 1939), par la méthode manométrique de Warburg, que l'intensité du pouvoir fermentatif des levures variait avec la nature de la substance azotée du milieu sur lequel elles étaient préalablement cultivées. Par la méthode de Langeron et Guerra, il est possible de démontrer plus directement cette action ; si, dans les tubes de fermentation, on remplace la peptone par du nitrate de potassium, le pouvoir zymatique est constamment diminué, même chez les levures assimilant cette substance (*Torulopsis utilis*, *Hansenula saturnus*). Or, les nitrates favorisent de façon générale l'immersion.

On est ainsi conduit à opposer fermentation, assimilation aérobie et une troisième forme d'assimilation dont nous avons démontré les liens avec l'éventualité d'une immersion et d'une lipogénèse abondante ; c'est l'*assimilation anaérobie*. Certains sucres, non assimilables selon les données de la méthode auxanographique de Beijerinck, le sont dans ces conditions particulières qui favorisent l'immersion. *La possibilité d'assimilation anaérobie n'a été rencontrée que chez des levures à pouvoir réducteur puissant*, qu'elles soient zymatiques (*Candida krusei*) ou non (*Candida lipolytica*).

Ce pouvoir réducteur puissant a été démontré d'une façon très simple : on ensemence les levures sur de la gélose peptonée-glyco-

sée, à laquelle on incorpore, suivant trois lots, du bleu de méthylène pur, du vert Janus et du rouge neutre, à une concentration de 1 p. 4.000, et on observe la coloration des colonies qui se développent. Avec le vert Janus, les colonies de *Candida lipolytica*, moins fortement celles de *Candida krusei*, prennent une teinte rose, tandis que le milieu rosit plus lentement. On en conclut que le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire de ces levures est normalement peu élevé et qu'elles ont un pouvoir réducteur puissant.

c. Avec la lipogénèse. — *Candida lipolytica*, dont le pouvoir réducteur est particulièrement puissant, est non seulement lipolytique, mais est une véritable levure à graisse, car son pouvoir lipoformateur est considérable, comme en témoigne l'abondance des enclaves lipidiques, surtout dans les circonstances expérimentales qui provoquent l'immersion.

Il a été démontré que toutes les circonstances tendant à élever le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire favorisaient la lipogénèse, la synthèse de corps très réduits, l'excrétion de corps autoxydables et le pouvoir antioxygène mutuel des lipides et des carotènes in vivo (Luteraan).

Il n'est pas sans intérêt de constater que cette lipogénèse est considérable chez des levures ayant un pouvoir réducteur important en aérobiose.

Fait non moins paradoxal, ce pouvoir réducteur puissant et ce pouvoir lipoformateur intense semblent maxima chez des levures azyamiques qui sont des levures à graisses.

Ceci fait entrevoir l'importance des processus de déshydrogénations en aérobiose ; ils seraient d'autant plus importants et plus intenses que le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire tendrait à être plus élevé au delà de sa valeur optima, par des artifices de milieu ou de culture. Qu'il y ait un lien entre la synthèse de corps très réduits et l'intensité de processus de déshydrogénation, faits contradictoires ou entachés d'impossibilité théorique à première vue, se trouve désormais confirmé. Magnus Lévy, en exprimant par l'équation globale suivante, admise par Terroine et ses collaborateurs, la formation de lipides à partir de glycéides :

a implicitement admis la coexistence de processus de déshydrogénation intense avec la synthèse de corps très réduits.

Cette équation laisse entrevoir que la lipogénèse est un processus biochimique anaérobie ; on trouve, en effet, des enclaves lipidiques importantes au niveau des éléments immergés.

Dans la lipogénèse, il y a deux processus biochimiques associés en part variable :

— oxydation du glucose : $C^6H^{12}O^6 + 6 O^2 \rightarrow 6 CO^2 + 6 H^2O$.

— conversion de glycéides en glycérides, après une série de déshydrogénations et de décarboxylations enzymatiques, dont le résultat global se trouve exprimé notamment par la formule de Magnus-Lévy.

L'association de ces deux processus, respiratoire et lipogénétique, explique comment, au cours de la lipogénèse, divers auteurs ont toujours trouvé un quotient respiratoire supérieur à l'unité (Lebreton).

L'existence de rapports entre l'immersion et la lipogénèse se trouve résumée dans le tableau suivant :

TABLEAU XIII

AGENTS	CROISSANCE	LIPOGÉNÈSE	IMMERSION	FILAMENTATION APPARENTE	FERMENTATION ALCOOLIQUE	Persistence des carotènes	RESPIRATION
Déséquilibre azoté.....	dim.	accrue	+	+		+	
Emploi des nitrates.....	var.	accrue	+	+	dim.		
Tyrosine.....	dim.	accrue	+	+	dim.		accrue
Glycérol.....	dim.	accrue	+	+	nulle	+	
Acidification du milieu.....	dim.	accrue	+	+	accrue		accrue
Déshydratation...	dim.	accrue	+	+			

Une action particulièrement remarquable est celle de la tyrosine : elle favorise constamment l'immersion, la filamentation et la lipogénèse. Cependant, l'existence d'une tyrosinase paraît assez exceptionnelle chez les levures. On peut la mettre en évidence en cultivant les levures sur un milieu contenant 2 p. 100 de gélose, 2 p. 100 de glucose, 1 p. 100 de tyrosine ; cette dernière, pratiquement insoluble, opacifie le milieu. Si le champignon assimile la tyrosine, il y a éclaircissement du milieu autour du champignon ensemencé (pl. IX, 17 et 18). Avec *Candida lipolytica*, il y a non seulement éclaircissement, mais production d'un pigment brun-rouge, puis noir, qui

envahit le milieu dans sa totalité. Mais que la tyrosine paraisse assimilée ou non, il y a constamment production d'enclaves lipidiques énormes chez les champignons étudiés et l'on doit admettre l'influence catalytique de l'élément azoté, présentement la tyrosine, dans cette expérience si simple.

4. Immersion et potentiel d'oxydo-réduction cellulaire. — L'immersion est une réaction à une action de longue durée de l'oxygène ; elle traduit une adaptation au cours de la vie aérobie des levures.

Quelle est la raison profonde de cette adaptation ?

En premier lieu, les levures sont, sans exception, des organismes aérobies, comme en témoignent les deux faits expérimentaux suivants :

- 1° l'absence de développement en anaérobiose absolue ;
- 2° la différenciation morphologique maxima en aérobie.

Ce sont des organismes médiocrement aérobies, comme l'avaient pressenti Langeron et Talice (1932). Nous avons trouvé une valeur décroissante du potentiel d'oxydo-réduction cellulaire chez les levures suivantes : *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica* qui, pourtant azymatique, possède un pouvoir réducteur particulièrement puissant, parce qu'il s'exerce non seulement à l'égard du vert Janus, mais aussi du rouge neutre ; nous pensons que le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire de cette dernière levure se situe entre $-0,1$ et $-0,2$.

D'autre part, des relations souvent étroites entre l'immersion et la lipogénèse font que l'attention est particulièrement attirée sur ce processus biochimique, constant en aérobie chez tous les organismes vivants. Elle augmente soit sous l'effet d'un accroissement de la tension en oxygène d'une atmosphère déterminée, soit sous l'effet d'une stimulation respiratoire (emploi de la tyrosine), facteurs qui tendent à élever le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire. Si d'autres actions produisent le même effet (déséquilibre azoté, emploi des nitrates, emploi du glycérol, acidification progressive du milieu, déshydratation), elles ne peuvent intervenir qu'en élevant le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire, qu'il y ait ou non augmentation de la tension en oxygène, qu'il y ait ou non stimulation de la respiration. Nous exprimons ces résultats encore d'une autre manière : il y a *convergence physiologique* par action finale sur un facteur commun, qui est le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire, lequel tend à être élevé au delà de sa valeur optima. Ces faits sont bien conformes à la grande loi biologique énoncée par l'école française des physiologistes en matière végétale, à savoir que la diffé-

renciation morphologique s'opère constamment dans le sens de l'activité physiologique accrue ; elle se trouve vérifiée à propos des relations si étroites entre l'immersion, manifestation morphologique, et la lipogénèse, manifestation biochimique.

Le fait de trouver des enclaves lipidiques au niveau des éléments immergés nous a permis d'envisager que *la lipogénèse est un processus biochimique anaérobie*, comme le laissait présumer l'équation de Magnus Lévy, et d'énoncer le principe suivant : *plus le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire tend à être élevé, plus s'intensifient les processus de déshydrogénation, plus il y a synthèse de corps très réduits.*

Le fait que ces corps réduits sont fréquemment autoxydables et se trouvent finalement excrétés, étant accumulés sous forme d'enclaves lipidiques plus ou moins importantes dans les cellules âgées ou mortes, permet de considérer cette lipogénèse comme une manifestation d'une activité physiologique particulière que nous avons dénommée : *fonction antioxygène physiologique.*

Le bien-fondé de cette conception se trouve vérifié par le fait qu'il existe d'autres manifestations de ce pouvoir antioxygène physiologique, évidentes dans certaines circonstances où l'on tend, comme précédemment, à élever le potentiel d'oxydo-réduction cellulaire. Ce sont, en dehors de l'immersion et de la lipogénèse, l'excrétion de substances autoxydables et notamment de pénicilline et le pouvoir antioxygène maximum des lipides et des carotènes, évident chez les Rhodotorulacées par la durée de la persistance de la pigmentation maxima, lorsqu'on les cultive sur glycérol ou sur acide oléique.

Ainsi se trouve confirmée, par un ensemble d'observations et d'expériences simples, la signification physiologique de ce caractère morphologique, l'*immersion*, découvert par l'un de nous en 1932, dont l'étude nous a amené à préciser qu'il n'était qu'une des manifestations d'une activité physiologique particulière jusqu'alors méconnue et qui paraît être générale chez l'ensemble des organismes vivants : *la fonction antioxygène physiologique.*

IV. — VALEUR MORPHOLOGIQUE DE L'IMMERSION CHEZ LES LEVURES

La petite collection dont dispose la section de mycologie de l'Institut de parasitologie de la Faculté de médecine de Paris ne nous a pas permis d'avoir une vue d'ensemble sur toutes les espèces, ni même sur tous les genres.

Une classification simple des champignons levuriformes a été donnée par l'un de nous au cours de son enseignement (1).

Elle a été établie dans un but essentiellement pratique et distingue :

I. LEVURES BASIDIOSPORÉES : *Sporobolomyces*, *Bullera*, etc.

II. LEVURES ASCOSPORÉES :

A. *Saccharomycétacées*, levures vraies *blastosporées*.

B. *Endomycétacées*, levures vraies *arthrosporées*.

III. LEVURES ANASCOSPORÉES :

A. **Torulopsidales** (Buchwald 1939), levures *blastosporées* anascosporées.

a. *Rhodotorulacées* : *Rhodotorula*.

b. *Torulopsidacées* avec les deux sous-familles :

1° *Torulopsidoïdées* (Buchwald) avec les genres *Torulopsis*, *Kloeckera* (levures apiculées), *Mycoderma*.

2° *Candidoïdées* (Buchwald) avec les genres *Candida*, *Brettanomyces*.

B. **Geotrichales** (Langeron, 1948), levures *arthrosporées* anascosporées avec les genres :

1° *Geotrichoides*, arthrosporé et blastosporé, avec pseudo-conidies, intermédiaire entre blastosporés et arthrosporés.

2° *Geotrichum*, purement arthrosporé.

3° *Trichosporon*, arthrosporé avec *appressorium*.

4° *Pityrosporum* (lipophile).

Les Geotrichales, levures anascosporées arthrosporées, font pendant aux Endomycétacées, levures vraies (ou ascosporées) arthrosporées.

En ayant présente à l'esprit cette classification pratique et en se référant aux ouvrages classiques de Stelling-Dekker, Lodder et Diddens et Lodder, pour la description des genres et espèces, la détermination des souches se trouvera grandement facilitée si on se reporte à ce qui a été exposé dans les précédents chapitres et à des publications antérieures (Langeron et Guerra, 1938 ; Langeron et Lutteraan, 1947).

Nous pensons qu'il est intéressant d'exposer ici une méthode générale de détermination plus complète, et à notre avis plus sûre, que celles généralement proposées :

(1) Cours complémentaire de mycologie médicale (juin-juillet 1948) donné à l'Institut de parasitologie de la Faculté de médecine de Paris.

1. Purification. — En premier lieu, il faut éliminer les bactéries d'une culture qui peut être souillée, par passage en liquide de Raulin pendant 8 à 10 jours. Des observations importantes peuvent être faites dès ce stade. Certaines levures font fermenter le Raulin et peuvent même y produire un voile, tel est le cas de *Candida krusei*.

2. Isolement. — En second lieu, on pratique l'*isolement* de la levure purifiée ; la méthode la meilleure nous a paru être celle qui est fréquemment usitée en bactériologie, c'est-à-dire le procédé des trois tubes (1).

En matière d'isolement, mieux vaut ne pas recourir à des milieux trop riches et pratiquer des ensemencements légers ; on est plus sûr d'obtenir un bon isolement et d'avoir une culture à partir d'une colonie isolée.

3. Ensemencement. — Avec le prélèvement ainsi fait, on ensemence par points deux tubes de gélose à 2 p. 100, glycosée à 2 p. 100 et peptonée à 1 p. 100.

Le premier tube sert à l'étude des caractères macroscopiques des colonies sur ce milieu standard. Le second tube est destiné aux prélèvements à faire.

4. Examen. — On pratiquera en premier lieu un *examen microscopique dans du Lugol fort* (taille, forme des cellules, filaments, levure blastosporée ou arthrosporée) ; on fera ensuite la recherche d'ascospores sur des étalements et au moyen des nouvelles méthodes que nous avons décrites (1947).

5. Cultures sur lames. — Cet examen microscopique est complété par la *culture sur lames* qui permet de déterminer l'existence et les caractères de la filamentisation, la présence ou l'absence d'ascospores, leur disposition *in situ*, grâce aux nouvelles méthodes de coloration.

6. Epreuve de fermentation. — On recherche la *fermentation du glycose* par la méthode de Langeron et Guerra, et c'est seulement lorsqu'elle est positive que l'on étudie le pouvoir fermentatif à l'égard du saccharose, du maltose, du lactose, du raffinose, la fermentation du galactose et des autres sucres n'ayant pas d'intérêt pratique.

(1) On ensemence dans l'eau de condensation du premier tube, on incline celui-ci rapidement, mais de sorte que l'eau de condensation se soit bien étalée à la surface de la gélose inclinée, puis on redresse le tube et, au niveau de l'eau de condensation à nouveau déposée dans le fond du tube, on fait un prélèvement avec lequel on ensemence l'eau de condensation du deuxième tube et on agit comme pour le premier ; à partir du deuxième tube, on ensemence identiquement le troisième.

7. Milieux différentiels. — On ensemence sur les *milieux différentiels* suivants qui ont ou auront, à notre avis, une grande valeur : milieu de Czapek (voir page 157) ;

milieu succinate d'ammonium 1 p. 100 et glycérol 2 p. 100 (voir page 156) ;

milieu tyrosine à 1 p. 100 et glycosé 2 p. 100 (voir page 170) ;

D'autres milieux : milieu gélatiné, milieu au lait, présentent généralement moins d'intérêt et ne conviennent que dans des cas particuliers.

Le milieu classique de Sabouraud est à rejeter formellement.

8. Recherche du voile. — La *formation d'un voile* s'observe parfois sur l'eau de condensation de milieux solides précédents, quand l'extension des colonies est rapide. Il ne faut pas se contenter des milieux peptonés ou au moût de bière, car leur composition n'est pas définie et les résultats obtenus ne sont pas comparables. Il faut employer le milieu à l'alcool de Stelling-Dekker ou au glycérol à dose moitié moindre, le milieu de Raulin glycosé, le milieu de Czapek liquide, et toujours employer des tubes neufs 18 × 18, parfaitement dégraissés, avec une hauteur constante de liquide (10 cm.). L'ensemencement sera toujours minime, en partant d'une culture jeune et en trempant simplement l'anse.

9. Epreuves d'assimilation. — Enfin, on pratiquera l'épreuve la plus délicate, à savoir l'*auxanogramme des sucres et des substances azotées*. Toutes les indications relatives à cette méthode précieuse sont contenues dans le mémoire de Langeron et Guerra (1938) et dans un mémoire plus récent de Luteraan ; il y a avantage, comme il a été indiqué, à ajouter parfois au milieu pour auxanogramme de l'aneurine. L'auxanogramme peut être appliqué à l'étude de l'assimilation de différents acides organiques : pyruvique, succinique, citrique, lactique, tartrique, oxalique, acétique, etc..., les quatre premiers nous ayant paru être constamment assimilables ; à l'assimilation de différents acides gras (oléique, palmitique, ricinoléique, etc...) ; à l'assimilation de différentes substances azotées (citrulline, arginine, xanthine, acide urique, etc...) ; par exemple, *Rhodotorula rubra* assimile ces quatre dernières substances, de même que les différents acides gras énumérés ci-dessus. L'avenir indiquera la valeur, pour la détermination, de ces nouvelles épreuves.

Si les épreuves biologiques ont une importance considérable, on voit, par les diverses expériences décrites ci-dessus, que les caractères morphologiques ont non moins de valeur pour la détermina-

tion des levures. Parmi les caractères macroscopiques, nous n'hésiterons pas à dire que l'*immersion*, jusqu'ici méconnue, a une importance aussi grande que l'existence d'un voile. C'est un caractère majeur de détermination. On notera si elle est précoce ou tardive ;

si elle est précoce, elle est toujours liée à une filamentisation avec pseudo-mycélium et elle oriente surtout vers le genre *Candida* ; si elle est tardive, elle peut être liée à une filamentisation avec pseudo-mycélium ou à une pseudo-filamentisation en chaînettes. La culture sur différents milieux solides de base permettra mieux encore de juger des caractères de l'immersion et de ses variations.

On peut résumer dans le schéma ci-contre les différentes épreuves à pratiquer pour la détermination d'une levure.

RÉSUMÉ

L'*immersion*, toujours secondaire à une phase de développement végétatif en surface, peut être précoce ou tardive ; *précoce*, elle est toujours liée à une filamentisation vraie ou pseudo-mycélium ; *tardive*, elle peut être liée à une filamentisation vraie ou à une pseudo-filamentisation en chaînettes.

Elle peut être spontanée ou provoquée expérimentalement. Elle ne se présente que chez des champignons se développant en présence d'oxygène. Différentes circonstances favorisent l'immersion chez les levures : le déséquilibre azoté, l'emploi des nitrates, de la tyrosine, du glycérol, l'acidification progressive du milieu par utilisation de certains sels d'ammonium, la déshydratation. En présence de certains sucres, non assimilables selon les données de la méthode auxanographique de Beijerinck, il peut y avoir une *assimilation adaptative*, que nous avons appelée *assimilation anaérobie* et qui aboutit à la synthèse de lipides.

L'immersion apparaît comme une réaction à une action de longue durée de l'oxygène ; c'est, à proprement parler, une réaction à l'action de l'oxygène de la part d'organismes ayant normalement un potentiel d'oxydo-réduction cellulaire peu élevé en aérobiose, ce qui n'exclut pas que les levures sont des organismes aérobies.

L'immersion est une manifestation d'une *fonction antioxygène physiologique*. C'est ce que confirment ses rapports étroits avec la lipogénèse et l'existence d'autres manifestations d'un pouvoir antioxygène physiologique, telles que l'excrétion de corps autoxydables, le pouvoir antioxygène réciproque des lipides et des carotènes. Ceci a été amplement exposé, ainsi que la notion importante et nouvelle de *convergence physiologique*.

Enfin, la valeur morphologique de ce caractère est considérable, car il est individuel, car il présente des variations dans sa date d'apparition, comme dans son aspect, car enfin son étude a entraîné la recherche de milieux différentiels particulièrement intéressants.

BIBLIOGRAPHIE

- BENHAM (R. W.). — *J. infect. dis.*, XLIX, 1931, 183-215.
CHAMPEAU (M. F.) et LUTERAAN (Ph. J.). — Sur quelques données histochimiques et physiologiques concernant des champignons levuriformes. *Ann. de paras.* XXI, 1946, 345-355.
DAÏREUVA (M.-P.). — *Thèse Fac. méd.*, Nancy, 1899.
DU BOIS (Ch.). — *Ann. dermat. et syphil.*, 1910, 447-456, 3 pl.
HARTER (A.). — *Thèse Fac. méd.*, Nancy, 1909.

- LANGERON (M.). — *Précis de mycologie*, Paris, Masson et Cie, 1945.
- LANGERON (M.) et GUERRA (P.). — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Ann. de paras.*, XVI, 1938.
- LANGERON (M.) et MILOCHEVITCH (S.). — *Ann. de paras.*, VIII, 1930, 422-436 et 465-474.
- LANGERON (M.) et TALICE (R.-V.). — Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes. *Ann. de paras.*, X, 1932, 1-80, pl. I-V.
- LUTERAAN (Ph. J.). — Rapports physiologiques entre diverses synthèses chez les champignons. *Ann. de paras.*, XXII, 1947, 442-448.

EXPLICATION DE LA PLANCHE IX

1. — *Candida albicans* (souche 118). — Milieu au nitrate d'ammonium et maltose (pigment vert) : très forte immersion (p. 160).
2. — *Candida albicans* (souche 118). — Milieu polyvitaminé : forte immersion.
3. — *Candida albicans* (souche 118). — Milieu au succinate d'ammonium et dextrose : très forte immersion (p. 159).
4. — *Candida albicans* (souche 118). — Milieu au sulfate d'ammonium et maltose : forte immersion (p. 160).
5. — *Candida albicans* (souche 118). — Gélase brute 2 p. 100 et glycose pur 7,5 p. 100 : faible immersion (p. 160).
6. — *Candida albicans* (souche 118). — Gélase peptonée, non sucrée (milieu de conservation) : très faible immersion (p. 160).
7. — *Candida krusei* (souche 1046). — Milieu à 7,5 p. 100 de saccharose et 1 p. 100 de peptone : forte immersion zonée (p. 166).
8. — *Candida krusei* (souche 1046). — Milieu à 2 p. 100 de saccharose et 1 p. 100 de peptone : croissance très faible (p. 166).
9. — *Candida krusei* (souche 1046). — Gélase brute 2 p. 100 et glycose pur 7,5 p. 100 : forte immersion (p. 166).
10. — *Candida lipolytica* (souche 112). — Milieu équilibré en azote : faible immersion (p. 162).
11. — *Candida lipolytica* (souche 112). — Milieu déséquilibré en azote, gélase brute 2 p. 100 et glycose pur 7,5 p. 100 : très forte immersion (p. 162).
12. — *Candida lipolytica* (souche 112). — Milieu au nitrate d'ammonium et alcool éthylique 1 p. 100 : assez forte immersion (p. 163).
13. — *Saccharomyces muciparis* (souche 96). — Milieu polyglycidique LL : forte immersion (p. 152).
14. — *Debaryomyces hudeloi* (souche 599). — Milieu au succinate d'ammonium-glycérol : immersion légère (p. 156).
15. — *Torulopsis utilis* (souche 104). — Milieu de Czapek : forte croissance, immersion très faible et très tardive (p. 158).
16. — *Hansenula saturnus* (souche 124). — Milieu de Czapek : bonne croissance, pas d'immersion (p. 156).
17. — *Candida lipolytica* (souche 112). — Milieu tyrosine-glycérol : assimilation de la tyrosine et éclaircissement du milieu à ce niveau. Il y a en même temps production d'un pigment brun rouge, puis noir, qui envahit la totalité du milieu (revers des colonies) (p. 170).
18. — *Fusarium solani*. — Milieu tyrosine-glycérol : assimilation de la tyrosine et éclaircissement du milieu à ce niveau (revers) (p. 170).

- Remarques sur les antibiotiques, principalement d'origine fongique. *Ann. de paras.*, XXII, 1947, 110-124.
- LUTERAAN (Ph. J.) et CHOAY (J.). — Données expérimentales sur l'origine, la formation et le rôle des pigments caroténoïdes chez les *Rhodotorula*. *Ann. de paras.*, XXII, 1947, 110-124.
- MOTTA (R.). — *R. Accad. dei fisiocritici, Siena*, 1926.
- PINOY (in BRAULT et MASSELOT). — *Ann. de dermat. et syphil.*, 1911, p. 592-602.
- SHAW (F. W.). — *Contrib. f. Bakt., Orig.*, CXIX, 1930, 460-464, 1 pl.
- VANBREUSEGHEM (R.). — Sur une levure, *Candida truncata* n. sp., isolée d'une dermatose présentée par le Dr Eyckmaus. *Arch. belges de dermat. et syphil.*, IV, 1948, fasc. 4.

Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris
(Directeur : Prof. H. Galliard)
Section de Mycologie (Chef de Service : Dr M. Langeron)