**ETUDE D'UNE COLLECTION NORVÉGIENNE
DE LEVURES ISOLÉES D'EXPECTORATIONS DE MALADES
ATTEINTS D'ASTHME OU DE BRONCHITE**

Par M^{lle} Edel DIETRICHSON

Avant de présenter cette étude, nous tenons tout d'abord à remercier chaleureusement M. le D^r Einar Aaser, Directeur de l'Institut National de la Santé Publique à Oslo, qui, s'étant mis en rapport avec le D^r Maurice Langeron, Chef de la Section de Mycologie médicale de l'Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris, nous a permis de travailler à deux reprises, pendant plusieurs mois, à Paris. Nous avons trouvé auprès de notre Maître, le D^r Aaser, une bienveillance et une compréhension dont nous lui savons tout particulièrement gré. Au cours de nos longues recherches, il n'a cessé de nous encourager par son exemple, et nous le remercions de la confiance qu'il a bien voulu nous témoigner en nous laissant toute liberté dans la conduite de notre travail.

Nous prions également le D^r Maurice Langeron de trouver ici l'expression de notre reconnaissance. Au cours de nos deux séjours à Paris, d'abord en 1939, puis après la guerre, en 1947-1948, il nous a dispensé sans réserve une aide que nous ne saurons jamais assez apprécier. C'est grâce à lui que nous avons pu mener à bien nos recherches et achever l'étude de la collection norvégienne de levures.

Nos remerciements vont aussi à M. le Prof. Emile Brumpt, à cette époque Directeur de l'Institut de Parasitologie, qui nous a autorisée à travailler dans son Institut. La bonté compréhensive que nous y avons rencontrée a contribué dans une large mesure à rendre notre stage très attachant.

Nous remercions M^{lle} Simone Dreyfus, assistante du Service de Mycologie médicale, de sa fidèle collaboration. Elle a contribué à assurer le succès de nos recherches sur les levures.

Nous remercions enfin M^{me} Ingrid Liaaen, assistante à l'Institut

de la Santé Publique à Oslo, qui n'a pas hésité à venir nous retrouver à Paris, pour consacrer bénévolement plusieurs mois d'activité à nos recherches. Nous lui savons le plus grand gré du zèle dont elle a fait preuve et de l'intérêt qu'elle a porté à nos travaux pendant tout le temps qu'elle fut notre assistante.

Que la Fondation Pasteur d'Oslo, au précieux concours de laquelle nous devons d'avoir pu poursuivre nos recherches à la Faculté de Médecine de Paris, trouve ici l'expression de notre très profonde reconnaissance.

Le Fonds médical des Usines norvégiennes pour les levures et l'alcool (a/s he hosshe Gjaer-Sprittfabrikhers Medisinske fond) nous a manifesté à deux reprises une grande bienveillance. Nous tenons à lui en dire ici notre vive reconnaissance.

Introduction. — En 1932, le D^r Einar Aaser a isolé quelques souches de levures et de champignons levuriformes, provenant de malades souffrant d'asthme et de bronchite. Dès lors, et sur son initiative, la Section de Mycologie de cet Institut a commencé un examen fréquent des expectorations en vue d'isoler ces champignons. Des expectorations provenant de malades atteints d'asthme et de bronchite, adressées à la Section des Vaccins de l'Institut, ont été soumises à un examen systématique afin d'y rechercher des levures et des champignons levuriformes. En février 1933, et grâce à l'amabilité du D^r Sindre Lunde, l'Institut recevait 58 expectorations prélevées au Sanatorium de Glitre (Norvège). Du mois de décembre 1934 au mois de mars 1935, 414 expectorations adressées à la Section des Epidémies de l'Institut National de la Santé Publique, et suspectes de renfermer des bacilles tuberculeux, ont été examinées dans le but précité par la Section de Mycologie.

Les levures isolées, issues des expectorations provenant de la Section des Vaccins, ont constitué une partie importante de la collection norvégienne du D^r E. Aaser.

La présente étude porte également sur des levures et des champignons levuriformes isolés à partir de matières autres que des expectorations, ainsi que de maladies autres que celles que nous avons déjà mentionnées ; mais le nombre de ces souches est très réduit.

Pour désigner les souches, nous avons employé les abréviations suivantes : *V*, *Ep*, *G* ; elles signifient respectivement : *Section des Vaccins*, *Section des Epidémies*, *Sanatorium de Glitre*. Dans le cas où deux ou plusieurs souches de levures ou de champignons levuri-

formes ont été isolées chez le même malade, elles sont désignées par les lettres : *a*, *b*, *c*, etc...

Ayant reçu un grand nombre de souches, le D^r Aaser a demandé, à partir du mois de juin 1941, à la Section des Vaccins, de suspendre tous les envois d'expectorations dans lesquels on se proposait de rechercher des espèces du genre *Candida*.

Nous tenons à remercier vivement M. le Prof. Oscar Hagem, Docteur ès Sciences, Chef du Laboratoire de Botanique de l'Université de Bergen (Norvège), de nous avoir signalé la thèse de Mlle Jacomina Lodder (1934) et d'avoir bien voulu nous en prêter un exemplaire. A l'aide de cette monographie, et tant que les circonstances le permettaient, nous avons commencé un groupement des souches isolées.

La publication du mémoire de MM. Langeron et Talice (1932), mentionné par Mlle Lodder, nous a été à cette époque très utile pour les études que nous avons poursuivies sur la collection norvégienne. Dès que nous avons connu cet important travail, nous avons entamé une étude rationnelle afin de déterminer des espèces du genre *Candida*.

Le D^r Aaser, membre du Congrès International d'Hygiène qui s'est tenu à Paris en 1937, a eu l'avantage de prendre contact avec le D^r Maurice Langeron et de lui remettre 85 souches de levures appartenant au genre *Candida*. M. Langeron nous a rendu le grand service d'en déterminer les espèces.

En 1938, M. Aaser a communiqué, une seconde fois, à M. Langeron une série de 80 souches qu'il a eu l'amabilité de déterminer.

Historique. — Il existe déjà, dans d'importantes publications contemporaines, un historique très complet du genre *Candida* Berkhout 1923 (Langeron et Guerra 1938, Diddens et Lodder 1942, etc.). Nous ne donnerons donc qu'un bref aperçu du développement de cette question, depuis le moment où le Prof. Vuillemin (1910), médecin et savant français, a créé la notion de *blastospore*, jusqu'à l'époque où Mlle Berkhout (1923) a défini le genre *Candida*, représentant important des *blastosporés*, et lui a assigné sa place dans la classification.

Vuillemin (1910) a proposé d'appeler *thallosporés* les hyphomycètes dont les spores ne sont que des fragments du thalle. Ces thallosporés comportaient donc deux groupes : les *blastosporés* et les *arthrosporés*, suivant qu'ils produisent des blastospores ou des arthrospores.

Vuillemin (1914) a appliqué à tort la dénomination de *Monilia* à deux groupes de champignons de caractères morphologiques et physiologiques tout à fait distincts : d'une part, à des champignons levuriformes produisant des blastospores ; d'autre part, aux *Monilia* véritables, qui sont des phialosporés du genre *Sclerotinia*, agents de la pourriture brune des fruits. Les *Monilia* ont des conidiophores et des chainettes de spores basipètes et donnent des colonies duveteuses, tandis que les blastosporés ont des spores basifuges naissant par bourgeonnement, mode de multiplication végétative particulier aux champignons levuriformes (M. Langeron et P. Guerra, 1938, p. 36). Ceux-ci donnent des colonies crémeuses ou membraneuses.

Les *Monilia* véritables sont des parasites des plantes ou des saprophytes. Cela n'est pas nécessairement le cas des blastosporés que l'on trouve fréquemment chez les animaux, surtout chez les animaux à sang chaud.

L'étude morphologique des champignons levuriformes anascosporés n'ayant pas donné de résultats appréciables quant à la classification, A. Castellani et ses collaborateurs (1919) ont étudié cette question sous un angle nouveau. Ils écartent l'étude morphologique et emploient uniquement des méthodes biochimiques. Pour différencier les espèces, ils utilisent le fait que certains champignons levuriformes peuvent provoquer la fermentation alcoolique, dans des solutions renfermant des sucres fermentescibles. La propriété fermentative se manifeste par la production plus ou moins abondante de gaz carbonique.

A l'Université d'Utrecht, un savant hollandais, Mlle Christine-Marie Berkhout, a publié, en 1923, une thèse de doctorat ès Sciences, intitulée : *Les genres MONILIA, OIDIUM, OOSPORA et TORULA*. Cette thèse met un terme définitif aux opinions, jusqu'alors régnantes, de Vuillemin (1911) sur le genre *Monilia*.

Elle démontre que Vuillemin a confondu sous le nom de *Monilia* deux groupes de champignons très différents : les *Monilia* véritables (groupe Gmelin et Woronin *sensu* Vuillemin) et les Mycotorulées Ciferri et Redaelli (1929) (groupe Bonorden *sensu* Vuillemin). La thèse de Mlle C.-M. Berkhout est considérée par Langeron et Guerra (1938) comme une « révolution ». Ils écrivent à son sujet :

« En 1923, Mlle Berkhout a osé, la première, démembrement le genre *Monilia* tel que le concevait Vuillemin et élever le groupe Bonorden au rang de genre sous le nom de *Candida* Berkhout 1923, séparant ainsi définitivement les levures anascosporées, ou champignons levuriformes, des vrais *Monilia* (groupe Gmelin) avec lesquels ils n'ont absolument rien de commun. On peut dire que cette date de 1923 marque le début de la systématique rationnelle des levures anascosporées. »

Cette thèse est restée malheureusement peu connue pendant longtemps, car elle fut publiée en hollandais et tirée à un petit nombre d'exemplaires. Mais depuis qu'une traduction française en a été établie, en 1930, par le Prof. R. A. R. F. Baudet, de la Faculté vétérinaire d'Utrecht, il existe maintenant un exemplaire en français à l'Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris.

En 1932, M. Langeron et R.-V. Talice avaient commencé une étude systématique des champignons levuriformes par une méthode purement morphologique. Ils ont été parmi les premiers à décrire les phénomènes de filamentisation que présentent beaucoup de ces champignons dans les milieux liquides et même dans les milieux solides gélifiés, dans la profondeur desquels les filaments peuvent pénétrer et s'immerger. Ils ont été ainsi amenés à décrire plusieurs genres dont les limites se sont montrées indistinctes et qu'il a fallu abandonner dans la suite pour rassembler tous les champignons ainsi décrits dans le genre *Candida*. C'est ce qui a fait l'objet d'une nouvelle série de recherches de la part de M. Langeron et P. Guerra. Dans leur grand mémoire, paru en 1938, ils ont donné, grâce à l'emploi méthodique des *caractères macroscopiques* des colonies géantes en tubes et des cultures en milieux liquides (présence ou absence d'un anneau ou d'un voile), des *caractères microscopiques* des microcolonies sur lames gélifiées (filamentisation), et enfin des *caractères biologiques* (zymogramme et auxanogramme des sucres et de l'azote), une description complète des espèces valides, ainsi qu'une méthode facile et rapide de détermination. La grande monographie, publiée en 1942 par Mlles Diddens et Lodder, est venue confirmer et étendre ces premières recherches de l'Ecole française. Cette monographie a constitué la troisième partie de l'ensemble consacré par l'Ecole hollandaise à l'étude de la collection de levures de l'Institut de Baarn-Delft. Les deux premières avaient eu pour objet d'abord les levures ascosporées (Stelling Dekker, 1931), puis les levures anascosporées non filamenteuses (J. Lodder, 1934).

Technique générale d'isolement, de purification et de conservation des souches. — Nous avons procédé successivement à l'isolement des souches provenant :

- de la Section des Epidémies du S.I.F.F. (1) (souches *Ep*) ;
- du Sanatorium de Glitre (souches *G*) ;
- de la Section des Vaccins bactériens du S.I.F.F. (souches *V*),

(1) Institut National de la Santé Publique à Oslo.

que nous affecterons des caractéristiques : *Ep*, *G*, *V*, suivant leur provenance.

Souches Ep. — Elles proviennent d'expectorations adressées à la Section des Epidémies du S.I.F.F.

Les expectorations, après dilution dans de l'eau physiologique, sont ensemencées en moût de bière houblonné (11° Balling), Stelling-Dekker 1931, et en bouillon de carottes de pH 7 (1). Les souches étaient mises à l'éluve à 39° pendant 10 jours (2).

Souches G. — Elles proviennent d'expectorations de tuberculeux.

Au Sanatorium de Glitre on a pratiqué un ensemencement d'expectorations sur gélose au moût de bière non houblonné (10° Balling et gélosé à 2 p. 160). Les cultures ont été ensuite expédiées à la Section de Mycologie du S.I.F.F.

Souches V. — Elles proviennent d'expectorations envoyées à la Section des Vaccins bactériens du S.I.F.F. pour la préparation de vaccins auto-gènes. Dans ce but, l'expectoration doit être collectée dans un vase stérile après une bonne toilette buccale, de préférence à jeun, et après que le patient ait bu deux verres d'eau chaude. L'expectoration est diluée dans de l'eau physiologique stérile, puis ensemencée, parmi d'autres milieux, sur gélose spéciale (3) pour la croissance éventuelle des levures ou des champignons levuriformes.

Lorsque la croissance apparaît au bout de 24 h. à 37°, les souches étaient isolées, puis adressées à la Section de Mycologie du S.I.F.F.

Isolement et purification. — La purification et l'isolement comportaient trois opérations :

- 1° débarrasser les cultures des microorganismes bactériens ;
- 2° les séparer des moisissures ;

(1) 1 kg. de carottes est bouilli avec un litre d'eau pendant 3 heures. Le liquide filtré est amené à pH 7 et stérilisé par vapeur fluente pendant 30 minutes trois jours de suite.

(2) Bien que la température requise pour les cultures de champignons soit habituellement de 18 à 22°, la possibilité que certaines souches soient thermophiles explique qu'on les ait laissés se développer à une température de 30 à 37°.

(3)

Gélose spéciale

Extrait de veau 1 : 1	500 cm ³
Eau ordinaire	500 cm ³
Peptone de P. D.	10 gr.
Na ² HPO ⁴ Sörensen	0 gr. 2
NaCl pur	0 gr. 3
Gélose	23 gr.

Le liquide est amené à pH 5.4 et on y ajoute 5 p. 100 de moût de bière (20-22° Balling). Il est ensuite stérilisé par la vapeur fluente pendant une heure 3 jours de suite.

3° isoler les levures ou champignons levuriformes différents qui se sont parfois développés en même temps.

Voici comment nous procédons :

— Partir d'une culture en milieu liquide.

— Prélever avec une grosse anse une seule goutte de ce liquide que l'on dilue dans quelques cm³ d'eau stérile. Agiter, pour bien assurer le mélange. Parfois, en cas de souillure importante, trois dilutions successives sont nécessaires, en prélevant chaque fois une goutte de la dilution précédente et en la mélangeant de nouveau à de l'eau stérile.

— Finalement, porter une goutte de chaque dilution dans le fond d'une boîte de Pétri stérile ; il y a donc autant de boîtes de Pétri que de dilutions.

Verser par-dessus le milieu gélosé (glycosé à 2 p. 100 et peptoné à 1 p. 100 ou gélose au moût de bière), relativement refroidi, mais encore liquide, de façon à obtenir une émulsion homogène.

Les souches ainsi obtenues ont été soumises à la purification d'après la méthode des gouttelettes (Troepfchenkultur) de Lindner. Ce procédé a été employé pour toutes les souches jusqu'à la fin de 1939.

A partir de 1940, les souches ont été soumises à une purification par passage en liquide de Raulin, suivant Langeron et Guerra, suivi du procédé des dilutions (voir plus haut). Le liquide de Raulin est un milieu sélectif, capable, par son pH acide, de débarrasser les levures et les champignons levuriformes des bactéries (1938, p. 51). Nous pratiquons deux passages en liquide de Raulin d'une durée de 15 jours à 25°, le premier de 10 jours, le second de 5 jours, en complétant par deux procédés des dilutions. C'est ainsi que nous obtenons en général la purification des souches. Cependant, pour certaines souches, il a pu y avoir nécessité de passages plus nombreux en Raulin, en complétant bien entendu toujours par la méthode des dilutions.

Conservation des souches isolées et purifiées. — Les souches sont conservées dans une solution de saccharose à 10 p. 100, de préférence dans des flacons de Jørgensen (1940, p. 65). Nous citerons à ce propos Jørgensen (1895, p. 251) : « Il est de la plus haute importance que, même au bout de plusieurs années, on puisse toujours avoir à sa disposition exactement la même levure dont on avait fait choix, en la conservant au laboratoire, pure, dans une solution à 10 p. 100

de saccharose. Dans une telle solution, les levures de culture restent en vie pendant plusieurs années, sans altération de leurs qualités. »

A la place de ces flacons que nous n'avons pu nous procurer, nous avons employé des tubes à essai ordinaires.

Voici notre technique :

Répartir quelques cm³ (nous en prenons 6 à 7) de solution de saccharose à 10 p. 100 dans une série de tubes stériles. Stériliser à la vapeur fluente pendant 30 minutes 3 jours de suite. Ensemencer à partir d'une culture jeune sur milieu gélosé. Les tubes une fois ensemencés, leur bouchon en coton cardé est légèrement sorti, et les tubes sont mis à l'étuve à 25° ou à température ordinaire. Le lendemain, une fois le bouchon bien sec, il est refoulé, après flambage, à l'intérieur du tube, bien au-dessous de son orifice supérieur, de façon à ménager sous le capuchon en gutta-percha, mis en dernier lieu, un espace libre. En procédant ainsi nous avons beaucoup diminué le nombre des souches infectées. Insistons sur la nécessité de chauffer la gutta-percha, mise en place à la veilleuse, de façon à lui imprimer par pression des doigts une bonne adhérence au pourtour de l'orifice supérieur du tube. Plus récemment, nous avons remplacé le capuchon en gutta-percha par un bouchon en caoutchouc stérile, ce qui nous a rapporté une épargne de temps.

Pour le repiquage annuel on fait un ensemencement sur milieu gélosé, et une fois la culture jeune suffisamment développée, nous le rapportons en saccharose. Garder à l'abri de la lumière à une température peu élevée. Nous conservons les souches à la température de la chambre. La collection norvégienne du D^r E. Aaser a pu être conservée pendant des années en ne repiquant qu'une fois par an environ.

Détermination des champignons levuriformes et des levures. — Cette détermination comporte une série d'opérations que nous exposerons suivant l'ordre dans lequel elles doivent être faites :

1. Recherches microscopiques.
2. Etudes de la morphologie macroscopique des cultures.
3. Etude des réactions biochimiques.

I. — RECHERCHES MICROSCOPIQUES

1° *Recherche des ascospores.* — Cette recherche est l'élément de base de toutes les études se rapportant aux levures anascosporées. Jusqu'ici, rien n'était plus difficile et plus incertain que d'affirmer définitivement l'absence de formation d'ascospores. Langeron et Luteraan ont observé que la sporulation se faisait facilement dans

les cultures sur lame ; mais alors que jusqu'ici on ne pouvait la mettre en évidence directement, une technique de coloration, mise au point par ces auteurs, montre bien la formation, l'aspect des asques et des ascospores et le développement de ces dernières *in situ*.

2° *Culture sur lames*. — La culture sur lames gélosées, suivant la méthode de Rivalier et Seydel (1932), permet d'étudier les champignons *in situ*, d'apprécier exactement leur morphologie tant en aérobiose qu'en atmosphère de gaz carbonique (Langeron et Guerra, 1938, p. 68). Par suite des importants perfectionnements apportés par M. Langeron et P. Guerra (1938), tant au point de vue de la culture proprement dite qu'au point de vue de la coloration, cette méthode tend à supplanter définitivement, pour l'étude des champignons levuriformes, la méthode des cultures en goutte pendante. Les cultures se font soit en milieu gélosé ordinaire, soit de préférence en gélose pomme de terre-carotte qui provoque une filamentation plus marquée.

La culture sur lames révèle l'aspect du pseudo-mycelium et la disposition topographique de l'appareil sporifère. Mais elle est insuffisante pour permettre la détermination certaine des espèces, sauf pour le groupe *albicans*, caractérisé par ses chlamydospores, et encore faut-il que ces dernières apparaissent.

Pour le cas où l'on n'obtiendrait pas de filamentation, il faudrait cultiver sur eau de pomme de terre, suivant la méthode de Talice, pour bien reconnaître s'il y a ou non formation d'un pseudo-mycelium ou seulement d'ébauches.

3° *Préparation et stérilisation des milieux*. — Avant d'aborder le chapitre de la détermination, nous jugeons nécessaire d'insister sur les techniques de préparation des milieux et de leur stérilisation.

Les techniques de culture ont fait de grands progrès lorsqu'on a appliqué les méthodes de M. Langeron (1938, 1945), pour la préparation des milieux et pour leur stérilisation.

En ce qui concerne les milieux, la diminution des sucres dont le taux est ramené à 2 p. 100 au lieu de 4 p. 100 semble réaliser une concentration optima, sans apporter de modification morphologique par rapport à des concentrations plus fortes.

En ce qui concerne la stérilisation, nous adoptons la méthode suivante, qui a toujours été employée dans le laboratoire de Sabouraud et a été appliquée par Langeron et ses collaborateurs : stérilisation préalable de la verrerie, une heure à 150° au Poupinel ; pour la dissolution de la gélose et des autres constituants du milieu, on fait monter l'autoclave de 100 à 120° en vingt minutes, puis on

éteint ; on répartit en tubes et on procède à la stérilisation de la même manière, en montant de 100 à 120° en vingt minutes et en éteignant à ce moment. Par cette méthode, on assure une stérilisation parfaite sans altération (hydrolyse ou caramélisation des sucres).

II. — CARACTÈRES MACROSCOPIQUES

Etude de la morphologie macroscopique des cultures. — Nous étudierons successivement l'aspect des cultures sur milieu solide et en milieu liquide.

1° *Aspect des cultures sur milieu solide.* — L'ensemencement est pratiqué, suivant la méthode de Langeron et Guerra, en trois points et une courte strie, de manière à obtenir des colonies géantes en tubes. Nous ne procédons à la définition des caractères des colonies que lorsqu'elles sont arrivées à leur plein développement (généralement au bout d'un mois). On note alors leur couleur, l'état de leur surface, l'aspect de leurs bords, leur consistance, l'immersion dans le milieu si elle existe, et la filamentisation.

2° *Aspect des cultures en milieu liquide. Recherche des trois caractères : dépôt, anneau, voile.* — Ces caractères sont recherchés sur les milieux d'épreuve : moût de bière et eau peptonée à 1 p. 100, glycosée à 2 p. 100. Le moût liquide étant actuellement impossible à se procurer à Paris, il a été remplacé par l'eau peptonée, glycosée. Les résultats obtenus sont identiques à ceux de Diddens et Lodder. La présence ou l'absence d'un *voile* donne un caractère important pour le diagnostic de certaines espèces. On apprécie aussi la formation d'un anneau qui peut être caractéristique. Le milieu synthétique à l'alcool ne sert pas en principe à l'étude du voile, mais surtout à déterminer si la levure assimile ou non l'alcool, ce qui est montré par la présence ou l'absence de dépôt. On note aussi, s'il y a lieu, la présence de l'anneau et du voile. Voir, à ce sujet, Diddens et Lodder (p. 75) : « Il est absolument nécessaire, dans chaque essai, d'ensemencer, comme contrôle, une solution sans alcool, car même sans addition d'alcool éthylique il se produit fréquemment une certaine croissance. »

Pour la lecture, nous insisterons sur les points particuliers suivants :

1° employer des tubes de 18 cm. $\times$ 18 mm. pour bien apprécier les caractères du voile ;

2° maintenir à l'étuve à température absolument constante de 25° pour obtenir des résultats comparables entre eux ;

3° selon Cochet (1940, p. 12) : « Les résultats s'observent en général après trois semaines environ, à l'étuve de 25° ; mais des résultats nets, suivant les souches, peuvent être obtenus plus rapidement. » Nos observations personnelles nous ont montré qu'en général les résultats sont suffisants bien avant trois semaines et l'apparition d'un voile au bout d'un temps aussi long doit être considérée comme exceptionnelle.

III. — MÉTHODES BIOLOGIQUES DE DÉTERMINATION

Nous avons vu que les données morphologiques ne permettent pas, sauf cas exceptionnels, la détermination spécifique de la levure ou du champignon levuriforme. De très grands progrès sont encore possibles dans cette voie ; mais les méthodes biochimiques de détermination tiennent aujourd'hui la place la plus importante.

1° Les fermentations. — Les fermentations constituent, classiquement, le moyen le plus sûr de détermination biochimique des genres et espèces de champignons levuriformes.

Nous avons procédé strictement d'après la méthode de Langeron et Guerra (1938), sauf pour le cas du raffinose et celui de l'inuline. Wickerham (1943), par sa méthode, a pu mettre en évidence qu'une fermentation du raffinose est partielle ou totale sans faire fermenter directement le mélibiose proposé par Henrici (1941, p. 132).

Nous citerons du mémoire de Wickerham ce qui suit : « Faire donner à la levure son maximum de fermentation, puis ensemercer *Saccharomyces carlsbergensis* qui fait fermenter énergiquement le mélibiose. L'absence de gaz montre que la levure a fait fermenter le mélibiose. »

Par suite du manque des appareils employés par Wickerham, nous avons ensemené dans les tubes de fermentation de Guerra. Une série de 13 souches a été ensemenée d'après sa méthode.

Les tubes, avant d'être ensemenés de *Saccharomyces carlsbergensis*, ont été retenus à l'étuve pendant sept jours après l'apparition du gaz. C'est ainsi que quelques souches n'ont été ensemenées avec *S. carlsbergensis* qu'après 30 jours. Après avoir fondu le bouchon de paraffine, nous avons ensemené une culture jeune de *Saccharomyces carlsbergensis*, qui a fait fermenter fortement toutes les souches, c'est-à-dire que toutes les souches ont fait fermenter le raffinose pour un tiers. Nous avons obtenu des résultats concordants pour deux séries parallèles.

V. Nitzulescu (1941, p. 492 et 494) a tenté récemment de remettre en valeur la fermentation de l'inuline, car, depuis la publication de la méthode de Langeron et Guerra, limitée à la fermentation des hexoses, il a été reconnu que l'inuline est très difficilement hydrolysable (cf. H. Colin, 1945, p. 196, d'après Weidenhagen).

D'après V. Nitzulescu, l'inuline sert à distinguer *Candida pseudotropicalis* et *Candida guilliermondi*. Or, la première n'est pas, à proprement parler, un *Candida*, c'est le *Saccharomyces fragilis* et la fermentation du lactose est bien plus caractéristique. Quant à *Candida guilliermondi*, sa petite taille permet de la reconnaître immédiatement.

La fermentation de l'inuline, qui est un polymère du fructose, se ramène donc à celle de ce dernier sucre, qui fait double emploi avec le glycose. En outre, en ce qui concerne *Candida pseudotropicalis*, les fermentations ont peu d'intérêt (à part celle du lactose), car ce *Candida* est la forme imparfaite du *Saccharomyces fragilis* qui donne facilement des ascospores.

A propos de la fermentation de l'inuline, nous donnerons la description de la préparation du milieu selon Nitzulescu :

« 4 grammes d'inuline sont ajoutés à 200 cm³ d'eau peptonée à 1 p. 100. Comme l'inuline est presque insoluble à froid, le tout est chauffé à 70°, température à laquelle le sucre se dissout aussitôt. Le liquide était ramené à 70° avant d'être réparti dans les petits tubes de fermentation, précaution qui est d'ailleurs inutile parce que dans la proportion de 2 p. 100 l'inuline reste en solution et ne se précipite plus après le refroidissement du liquide à la température du laboratoire. On ajoute ensuite la paraffine d'après l'ingénieuse méthode de Guerra. »

2° Auxanogrammes ou méthode auxanographique de Beijerinck (1889). — La méthode auxanographique de Beijerinck pour l'élection des sucres et l'assimilation de l'azote a été adoptée et par l'Ecole hollandaise (J. Lodder, 1934 ; Diddens et Lodder, 1942) et par l'Ecole française (Langeron et Guerra, 1938).

La technique de l'auxanogramme a été bien mise au point par Mlle J. Lodder (1934) et par M. Langeron et P. Guerra (1938).

A. Auxanogramme des sucres. — Langeron et Guerra (1938, p. 166) ont supprimé l'utilisation d'une source d'azote pour l'auxanogramme des sucres ; l'aliment azoté est représenté par les impuretés contenues dans la gélose et qui suffisent pour permettre l'assimilation des sucres. Les résultats sont ainsi plus nets.

Ces mêmes auteurs emploient une gélose relativement concentrée

à 2 p. 100 de gélose. L'artifice qu'ils emploient (papier buvard) pour l'absorption de l'eau de condensation et éviter sa chute sur la préparation constitue un progrès technique important, car cette chute rend les préparations illisibles.

A ce propos, nous insisterons sur les points essentiels suivants :

1° partir d'une souche de 24 h. à 25° ;

2° effectuer une émulsion bien homogène des levures dans la gélose fondue ;

3° lire chaque jour les résultats et n'affirmer l'assimilation qu'en présence d'une zonation nette.

Les sucres étudiés ont été : glycose, saccharose, maltose, lactose, raffinose et, exceptionnellement, galactose.

B. Auxanogramme de l'azote. — Pour éliminer toutes les impuretés azotées et toute trace de corps étranger soluble, nous lavons la gélose à l'eau courante dans un sachet de toile pendant huit heures environ ; elle est rincée trois fois dans l'eau distillée ; enfin, il y a avantage à laisser tremper pendant plusieurs heures cette gélose lavée dans de l'eau distillée, et à ne la rincer qu'ensuite.

Nous utilisons les substances azotées suivantes : peptone, asparagine, histidine, urée, sulfate d'ammonium et nitrate de potassium. D'après Diddens et Lodder (1942, p. 75) : « (Assimilation de l'azote) ...l'assimilation du nitrate de potassium a une valeur spécifique ». Elle permet de séparer immédiatement les levures ascosporees du genre *Hansenula*, ainsi qu'un certain nombre d'autres, dites nitrophiles.

Les points suivants sont essentiels :

1° partir d'une souche de 24 h. à 25° ; c'est ici plus important que pour l'auxanogramme des sucres (Langeron et Guerra, 1938, p. 169) ;

2° ne déposer que des traces de sulfate d'ammonium et surtout d'urée, en raison de la grande diffusibilité de ces substances ;

3° garder les boîtes à l'étuve à 25° jusqu'au sixième jour ;

4° lectures répétées, car les résultats peuvent être tardifs.

Il est préférable de partager les épreuves entre deux boîtes de Pétri pour avoir un meilleur contraste et, dans l'une, ne doser que l'asparagine et l'urée ou la peptone et l'urée. C'est ainsi qu'une opacité discrète, du fait de l'assimilation de l'urée, ou aussi de l'histidine ou du sulfate d'ammonium, ne pourra passer inaperçue.

RECHERCHES PERSONNELLES

Nous ferons remarquer les points suivants portant sur quelques caractères morphologiques et biologiques.

Généralement, une analyse complète est faite des souches du groupe *albicans*. Il y a des exceptions pour quelques souches isolées d'*expectorations d'asthme*. Le nombre de souches déterminées par nous, portant des chlamydospores, est assez grand pour cette maladie : 70 souches sur 98. C'est pourquoi, nous avons réduit les analyses pour 37 souches, en n'examinant que des cultures sur lames d'après Rivalier et Seydel et le voile sur eau peptonée glycosée.

Les épreuves de fermentation sont conformes à Langeron et Guerra et Diddens et Lodder, à quelques rares exceptions. C'est ainsi, par exemple, que six souches de *Candida macedoniensis*, N° : 426, 525b, 427, 491, 493a, 495, ont donné un résultat négatif pour le galactose en divergence avec les données de Diddens et Lodder. L'élection des sucres pour le maltose a donné un résultat positif d'après nos examens, tandis que ce sucre est négatif d'après Diddens et Lodder. Toutes les souches de cette espèce et celle de *Saccharomyces marxianus* sont examinées sur l'inuline, ainsi que les souches de *Candida pseudotropicalis* et celle de *Saccharomyces fragilis*.

Toutes les souches de *Candida tropicalis* sont positives pour l'urée, sauf une. Quinze souches sur vingt et une de la même espèce ont été examinées sur du glycolle et du tryptophane.

Toutes les souches de *Candida krusei* attestent fortement et constamment l'assimilation de l'urée.

Nous étudierons, dans la suite de ce mémoire, à paraître prochainement, les deux catégories d'*expectorations* (catégorie principale, catégorie secondaire) que nous avons utilisées dans notre étude. De toutes ces catégories, nous avons isolé des espèces du genre *Candida*.

A. — Catégorie principale.

1. Origine indéterminée.
2. Asthme.
3. Bronchite.
4. Malades suspects de tuberculose pulmonaire.
5. Tuberculose pulmonaire.

B. — Catégorie secondaire.

6. Coryza chronique.

7. Laryngite simple.

8. Laryngite avec enrouement.

9. Trachéite.

10. Dilatation des bronches.

11. Les asthmes intriqués.

C. — Catégorie exceptionnelle.

12. Exanthème.

13. Ongles.

(A suivre).