Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 40 (1931)

Heft: 2

Artikel: Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces blakesleeanus : influence des substances vltaminiques

Autor: Schopfer, W.-H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-27069

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 25.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Recherches expérimentales sur la formation des zygotes chez Phycomyces blakesleeanus.

Influence des substances vitaminiques.

Par *W.-H. Schopfer*, Privat-docent à l'Université de Genève.

Ce travail fait partie d'un ensemble de recherches effectuées en 1930, à l'Institut de physiologie végétale de l'Université de Berlin, auprès du regretté Professeur H. Kniep. Nous adressons à la mémoire de ce savant un respectueux et reconnaissant hommage. Nous remercions vivement la fondation Rockefeller pour l'aide qu'elle nous a accordée.

Phycomyces, la Mucorinée qui nous a servi de réactif pour les présentes recherches, a été étudié quant à sa physiologie morphologique et à sa génétique par H. Burgeff (1914) qui lui a consacré plusieurs importants travaux. Sa croissance rapide, la grande dimension de ses zygotes en font un matériel expérimental de choix. Les conditions de formation de ses zygotes sont cependant assez mal connues. Burgeff et d'autres auteurs utilisent constamment comme milieu de culture le milieu malt-agar (malt 3 %, agar 1½ %) qui permet une croissance rapide, mais qui, comme tous les milieux naturels, ne permet pas de mettre en évidence l'influence particulière d'un constituant chimique défini. Comme problème de départ, nous nous sommes proposé d'appliquer à *Phycomyces* les mêmes méthodes que pour *Mucor hiemalis*, à savoir : partir d'un milieu de culture aussi défini que possible au point de vue chimique, faire varier régulièrement l'un des constituants afin d'observer quantitativement et qualitativement son influence, rechercher surtout l'influence du carbone (sucre) et de l'azote (asparagine), de même que celle du rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$.

Notre matériel nous a été fourni par le Professeur H. Burgeff, de Würzburg, qui nous a très aimablement fait parvenir 24 souches de *Phycomyces blakesleeanus* choisies parmi 5 générations issues d'une seule zygote de départ. Le professeur H. Kniep nous a donné deux souches de *P. blakesleeanus* et deux de *P. nitens*. Ce matériel a été complété par deux souches de *P. blakesleeanus* livrées par le Dr F. Blakeslee de Washington. Nous adressons à ces savants tous nos remerciements.

Il y a intérêt, dans une étude de ce genre, à travailler sur des souches variées, de provenances géographiques diverses, afin de se rendre compte s'il existe des manifestations physiologiques caractéristiques d'une race, d'une souche particulière et non pas seulement liées à l'espèce; souvent, cette spécificité physiologique de souche a été constatée en mycologie physiologique.

Nous avons presque toujours travaillé avec *Phycomyces blakesleeanus;* comme Burgeff l'a montré, cette espèce est distincte du *Phycomyces nitens* classique et a souvent été confondue avec elle. Les différences portent surtout sur la forme et les dimensions des spores; cependant les deux espèces se croisent facilement et donnent des zygotes bien développées.

1. Morphologie de la formation des zygotes.

Les sexes (+) et (—) étant ensemencés sur malt-agar à quelques centimètres de distance, la croissance se fait normalement.

Il y a isogamie parfaite entre les deux progamétanges de la zygote; ils sont fréquemment remplis d'une graisse à laquelle est jointe de la carotine (décelée par la méthode de microsaponification de Molisch). Toutes les souches, même de sexe opposé et bien défini, ne sont pas aptes — sur le même milieu — à fournir des zygotes. Nous retrouvons avec *Phycomyces* les mêmes faits observés précédemment avec deux couples de *Mucor hiemalis :* il existe des couples de souches qui fournissent une abondante récolte de zygotes et d'autres avec lesquels les affinités sexuelles se manifestent d'une manière beaucoup plus restreinte (cf. Wesendonck 1930). Il se pourrait fort bien que le même milieu nutritif ne convienne pas également à tous les couples. De toutes façons, il faut être prudent lorsqu'on n'obtient pas de zygotes avec un

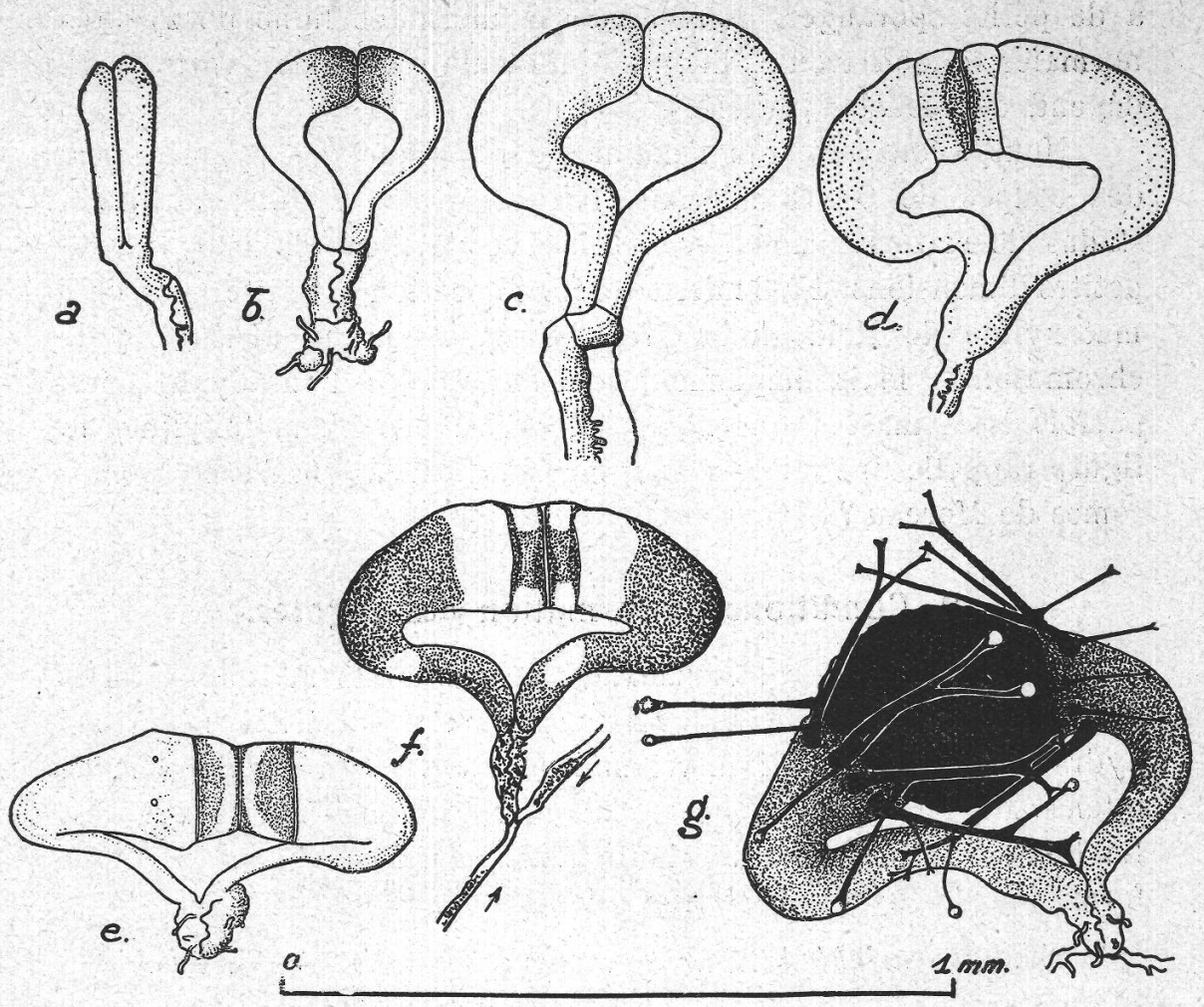

Fig. 1. Divers stades de la formation de la zygote chez Phycomyces.

couple donné et rechercher avant tout si une modification du milieu n'amènerait pas les souches à un état dans lequel les affinités sexuelles se manifesteraient d'une manière plus intense.

La durée de la formation des zygotes (sur malt-agar, température extérieure 18° env.) est de 7 à 10 jours; dès le quatrième jour on peut observer des débuts de zygotes.

Parfois, pour des causes mal déterminées qui doivent relever tant *de l'état génétique et de l'épuisement des souches* que du milieu nutritif, la formation des zygotes avorte; malgré un contact des hyphes de sexe opposé, la zygote ne se forme ou ne s'agrandit pas; la ligne de contact apparaît macroscopiquement sous forme d'une ligne blanche; fréquemment dans ce cas, les progamétanges donnent naissance à des hyphes végétatives et parfois

à de petits sporanges. Souvent aussi, dans une ligne de zygotes normales, on en trouve un certain nombre qui ont avorté; celà dépend des souches utilisées.

Nous avons effectué l'examen cytologique des zygotes. Sur des coupes de 6—12 microns, faites sur des zygotes à divers stades de maturité, nous avons observé de nombreux noyaux de petites dimensions (1 à 3 microns). La coloration est faite avec l'hématoxyline de Heidenhain. Nous n'avons pas pu distinguer de chromosomes, mais simplement, aux deux pôles d'un noyau, deux, parfois trois masses fortement colorables par l'hématoxyline; la figure rappelle une mitose; peut-être s'agit-il là des deux chromosomes de Moreau ?

2. Conditions de formation des zygotes.

Le milieu le plus fréquemment utilisé est le malt-agar (malt 3 %, agar 1½ %); riche à la fois en substances nutritives (surtout hydrates de carbone) et en vitamines, il permet un développement intense du champignon et une abondante formation de zygotes. La température optima va de 15 à 20°; au-dessous de 15° C, la formation des zygotes est très ralentie.

a) Malt variable.[1] Agar constant : 1,5 g. % — Souches (+) et (—) de l'I. P.[2] Stérilisation $\frac{10 \text{ minutes}}{115^\circ}$. Obscurité. Température 18°.

Teneur en malt . .	10	5	2,5	1,25	0,68	0,34	0,17	0
Zygotes après 5 jours	600	260	94	75	45	20	5	0
Largeur de la ligne de zygotes après 5 jours (en. mm.)	7—8	4—5	3—4	3	1	1	(1)	—
Zygotes après 7 jours	1200	560	320	261	104	50	32	0
Zygotes après 8 jours	∞	900	480	295	104	55	32	0

(Le signe ∞ indique des zygotes très nombreuses impossibles à dénombrer.)

[1] Le malt est fourni par Kahlbaum.

[2] I. P. signifie : souches de l'Institut de physiologie végétale de Berlin.

Une très petite quantité de malt suffit à la formation de quelques zygotes; il y a proportionnalité entre la teneur en malt et le nombre des zygotes. Plus la teneur en malt est élevée, plus est grand le temps nécessaire à la genèse de toutes les zygotes que ce milieu pourra fournir.

La densité de la culture aérienne va croissant avec la teneur en malt.

Orban (1919), cultivant la même espèce sur du biomalt-agar trouve les chiffres suivants :

Biomalt	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128 %
Nombre des zygotes	92	67	53	39	20	12	4

b) Agar variable. Malt constant.

Mêmes conditions d'expérience que précédemment.

Teneur en malt : 3 %. Souches I. P. Stérilisation $\frac{10 \text{ minutes}}{115^{\circ}}$.

Teneur en agar . . .	5 %	2,5	1,25	0,68	0,34	0,17	0
Zygotes après 6 jours .	600	390	320	200	140	65	0
				milieu très fluide			
Largeur de la ligne de zygotes	7—8 mm	5	3—4	2—3	—	—	—

Nous ne pensons pas qu'il s'agisse d'une action chimique de l'un des constituants de l'agar, mais plutôt d'une action physico-chimique : densité et cohésion du milieu, de même qu'augmentation de la pression osmotique due aux colloïdes du milieu. Le mécanisme de cette action est d'ailleurs difficile à préciser.

Cette expérience prouve la nécessité, lorsqu'on étudie l'influence d'un constituant défini du milieu sur la formation des zygotes, de conserver une teneur en agar très constante; sans cela une cause d'erreur très importante est introduite.

c) Influence de l'épaisseur de la couche d'agar.

Mêmes conditions d'expérience que précédemment. Malt-agar (malt 3 %, agar 2 %) Souches Burgeff, 46 (+), 48 (—). Stérilisation $\frac{15 \text{ minutes}}{115^{\circ}}$. Obscurité. Température 20° C.

Epaisseur de la couche de milieu . .	1—1½ mm	3	4	5
Nombre de zygotes après 7 jours . .	11	120	150	190

Cette action de l'épaisseur du milieu est facile à comprendre : avant d'arriver en contact à leurs extrémités, les filaments des deux sexes plongent assez profondément dans le milieu; ils en ressortent ensuite et en se dressant entrent en contact pour former la zygote. Si la couche de milieu est trop mince, il va de soi que ce processus ne pourra se produire et que le nombre des zygotes sera restreint.

Cette expérience prouve la nécessité de ne pas utiliser une couche d'agar d'épaisseur trop faible, ou tout au moins de maintenir une épaisseur identique dans tous les essais d'une série, afin de pouvoir les comparer. Il est probable qu'à cette action mécanique de l'épaisseur du milieu s'ajoute aussi l'action de la quantité absolue de substances nutritives.

d) Influence du maltose variable.

Mêmes conditions d'expérience que précédemment. Milieu de Coons : KH^2PO^4 1,4 ‰; $MgSO^4$ 0,5 ‰; asparagine 1 ‰, maltose de Kahlbaum (de 3 à 20 ‰).

Stérilisation $\frac{15 \text{ minutes}}{115^\circ}$. Obscurité. Souches I. P.

Teneur en maltose . .	0	0,68	1,25	2,5	5	10	20 g ‰
Nombre de zygotes après:							
5 jours	0	0	0	0	9	—	0
6 »	0	0	0	1	9	—	20
7 »	0	0	0	3	11	—	60
9 »	0	1	1	26	18	—	300
11 »	0	1	1	85	(21)	—	340
16 »	0	1	1	180	(21)	—	390

La teneur maximum en maltose (20 ‰) a été choisie volontairement faible (au lieu de 10 % habituel) afin d'observer les variations de nombre de zygotes pour des petites modifications

du milieu. Comme pour *Mucor hiemalis,* il y a augmentation du nombre des zygotes avec une élévation de la teneur en sucre. (La série de 5 g. ‰ est un accident : couche trop mince de milieu !) Ces résultats sont valables avec la teneur utilisée en asparagine.

Notre notion du rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$ semble s'appliquer également pour *Phycomyces :* plus la dose d'asparagine est élevée — jusqu'à une certaine limite — plus la dose de maltose doit être forte, si l'on veut obtenir une formation normale de zygotes. Les faits que nous signalons plus loin constituent une confirmation indirecte de cette hypothèse.

e) Influence de la gélatine.

Le Professeur H. Kniep nous avait signalé qu'il était impossible d'obtenir des zygotes avec *Phycomyces* croissant sur un milieu gélatinisé. Partant de son observation, nous avons vérifié le fait en cherchant à le faire cadrer avec notre hypothèse.

Milieu : malt 3 %; agar 2 %; gélatine en quantité croissante (de ½ à 4 %) Stérilisation $\frac{\text{15 minutes}}{108^\circ}$. Obscurité. Température 18°. Souches : 46 (+), 48 (—) Burgeff.

Teneur en gélatine	0	½	1	2	4 %
Zygotes après:					
4 jours	290	140	160	125	60
7 »	310	180	290	190	80

Il y a donc décroissance nette du nombre de zygotes avec l'augmentation de la teneur en gélatine, mais en même temps augmentation extraordinaire de l'intensité du développement végétatif. Avec 4 % de gélatine, les sporangiophores verts sont épais, en masse serrée, tels que nous ne les avons obtenus dans aucune autre culture. *L'adjonction de gélatine constitue donc un moyen intéressant pour dissocier dans les cultures le développement végétatif et les phénomènes de la sexualité.* Il n'est pas nécessaire que le premier soit très fort pour que la sexualité se manifeste.

La gélatine, employée à des teneurs plus élevées, substitue entièrement l'agar.

Malt 3 %. Gélatine de 10 à 30 %. Stérilisation $\frac{15 \text{ minutes}}{105^{\circ}}$.
Souches : 46 (+), 48 (—) Burgeff.

Teneur en gélatine	10 %	20 %	30 %
Nombre de zygotes après:			
5 jours	2	0	0
14 »	60	0	0

Même observation que précédemment en ce qui concerne le développement végétatif qui, en l'absence de toute zygote, est extrêmement fort avec 30 % de gélatine.

Nous observons aussi une augmentation de l'alcalinité finale du milieu avec une teneur croissante en gélatine. (1re expérience.)

Teneur en gélatine	0	1/2	1	2	4 %
p^H. final	5 env.	7 env.	7,7	8	8—8,2

Nous nous sommes demandé également si l'un des sexes seul croissant sur milieu gélatinisé, la formation des zygotes serait empêchée.

Milieu : Gélatine 20 %, Malt 3 % (Agar 2 % à la place de gélatine). Lumière. Température 18°.

Souches 46 (+), 48 (—) Burgeff.

Les milieux gélatinisés et agarisés sont préparés séparément, coupés et interchangés.

Les ensemencements se font sur les milieux coupés et préparés; ils sont rapprochés de façon que les deux mycéliums se trouvent au bord en même temps.

En aucun cas, nous n'avons observé de zygotes sur la zone de contact, quel que soit le sexe croissant sur la gélatine. Le mycélium croissant sur gélatine présente sur le milieu une ramification coralloïde typique avec de nombreuses chlamydospores. Les sporangiophores sont fortement colorés et épaissis.

Cette inhibition disparaît si l'on repique le champignon sur un milieu sans gélatine. Deux fragments de mycélium (+ et —) sont placés sur un milieu malt-agar normal. Croissance normale du mycélium; à la zône de contact, il se forme de nombreuses grosses zygotes, normales.

Interprétation de ces résultats :

La gélatine contient une très forte proportion d'azote (glutine) assimilable; utilisée seule, elle peut servir à la nutrition des microorganismes. Sa valeur nutritive est cependant faible. Sous son aspect commercial, elle contient une proportion assez notable de HNO^3 (Pétri). En la purifiant selon la méthode habituelle, nous n'avons pas obtenu des résultats différents de ceux que donne la gélatine non purifiée.

Nous pensons que c'est l'introduction dans le milieu d'une très forte proportion d'azote qui doit inhiber la formation de zygotes. Cette teneur en azote est en disproportion avec la dose d'hydrate de carbone présente dans le malt. Le rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$ doit être diminué de telle façon que les manifestations des affinités sexuelles soient rendues impossibles. Des expériences effectuées avec des milieux à base *de maltose* et de gélatine, montrent également avec des teneurs élevées en gélatine, la même inhibition.

En ajoutant au milieu malt-agar, des peptones au lieu de gélatine, on observe les mêmes phénomènes d'inhibition sexuelle.

Teneur en peptones	0	1/2	1	2 %
Nombre de zygotes après 5 jours	180	54	12	0

(Milieu malt-agar, avec 1 % de malt.)

Ces expériences préliminaires précisent quelques-unes des conditions de formation des zygotes et serviront à comprendre l'action des substances actives qui sera étudiée plus loin.

3. Etude de l'action du maltose et de ses impuretés.

Au cours de nos recherches sur *Mucor hiemalis,* en étudiant l'influence du milieu nutritif sur la formation des zygotes et sur la croissance (hauteur du mycélium et poids sec de la culture) nous avons plusieurs fois été frappé par le fait que la glucose et le maltose donnaient des résultats sensiblement différents (1926). Nous n'avons pas alors prêté d'attention à ce phénomène.

Il est évident qu'il peut y avoir des raisons d'ordre chimique, stéréochimique pour que saccharose et maltose ou glucose et lévulose fournissent des résultats différents et ne soient pas utilisés de la même façon par une même race. Mais on voit difficilement comment expliquer une différence forte observée entre deux sucres voisins employés à dose isocarbonnée, toutes les autres conditions étant égales. Le champignon produisant probablement la maltase et hydrolysant le maltose dans le milieu de culture, les deux sucres utilisés doivent avoir la même valeur nutritive.

D'autre part, en employant pour étudier la formation des zygotes chez *Phycomyces,* deux maltoses différents : maltose ordinaire de Kahlbaum et un maltose cristallisé chimiquement pur de Schuchardt, nous observons, à notre grande surprise, que les zygotes se forment abondamment sur le maltose ordinaire, mais qu'il n'en apparaît aucune sur le maltose pur (milieu de Coons).[1] Cette observation fut le point de départ de notre étude.

a) Influence sur le développement végétatif.

Action comparée des divers sucres, les maltoses y compris.

Milieu : Coons liquide :	asparagine	0,8 g ‰
	SO^4 Mg	0,8 g ‰
	KH^2 PO^4	1,5 g ‰

[1] Coons, après de nombreux essais avec un champignon, compose son milieu de la façon suivante :

$MgSO^4 + 7$ aq.	: 2,466 g. in 50 cc. aq. dist.	: 1 cc.
KH^2 PO^4	: 1,36 g. » » » » »	: 5 cc. + 84 cc. aq. dist.
asparagine	: 1,33 g. » » » » »	: 5 cc.
maltose	: 3,60 g. » » » » »	: 5 cc.

Nous sommes parti de ce milieu initial, en modifiant, selon les besoins, les proportions des constituants.

L'auteur ne donne aucune indication sur la nature du maltose qu'il a utilisé; il indique cependant que pour *Pleodomus fuscomaculans* c'est le xylose et le maltose qui conviennent le mieux. Il n'est pas impossible que, sans s'en douter, il ait choisi le maltose à cause de ses propriétés particulières, qu'il ne semble pas connaître.

Les divers sucres sont utilisés en solution $\frac{N}{4}$

Les cultures sont faites dans des Erlenmayer de 250 cc. en verre de Jéna contenant 15 cc. de solution.

Stérilisation : $\frac{10 \text{ minutes}}{110^{\circ}}$.

Ensemencement avec souches 46 (+), 48 (—) de Burgeff.

Suspension de spores fraîches.

Température 18°.

Lumière du jour.

Résultats, 8 jours.

(Mycélium séché à 95°; pesée à la balance de précision, poids en milligrammes.)

Arabinose		Xylose		Glucose		Galactose	
(+)	(—)	(+) 4 (0)	(—) 11 (+ +)	(+) 6,5 (0)	(—) 11 (+)	(+) 5 (0)	(—) 10 (+)
Lévulose		**Mannose**		**Maltose ordinaire**		**Maltose pur**	
(+) 2 (0)	(—) 9 (—)	(+) 12 (0)	(—) 13 (+ +)	(+) 61,5 (+ +)	(—) 58,5 (+ + + + + +)	(+) 35 (+)	(—) 31 (+ +)
Saccharose		**Lactose**		**Raffinose**			
(+) 8 (0)	(-) 10 (+)	(+) —	(—) —	(+) 7 (0)	(—) 13 (+ +)		
Rhamnose				**Inosite**			
(+)	(—)			(+)	(—)		
très faible développement sur le fond du vase							

(0) = aucune émersion de filaments aériens.
(+) = croûte à la surface.
(+ + ...) = touffe d'hyphes aériennes de 1 à 7 cm.

Au quatrième jour, l'ordre de développement des cultures était donc le suivant (selon la hauteur du mycélium aérien).

Maltose ordinaire > maltose pur > raffinose > mannose > glucose > galactose > saccharose > lactose > xylose > rhamnose > inosite >.

Au huitième jour selon le poids sec du mycélium :

Maltose ordinaire > maltose pur, mannose et raffinose > glucose et xylose > saccharose et galactose > lévulose > rhamnose et inosite —.

Il y a correspondance approximative entre la hauteur du mycélium aérien et le poids sec surtout au début de la série.

Avec cette paire de souches, les différences entre les mycéliums des deux sexes se groupent en deux séries :

Avec les deux maltoses, le sexe (+) *a un mycélium aérien plus développé; malgré cela, un poids plus faible que le sexe (—).* Pour les autres sucres, le mycélium (—) a le poids le plus élevé, les différences sont moins accentuées. Nous en montrerons plus tard la raison. Nous insistons sur les différences obtenues avec maltose qui pour ce couple sont très régulièrement constantes; il ne s'agit pas d'un caractère accidentel. Pour les deux séries, la différence relative au mycélium aérien est très nette.

Il ressort de cette expérience que le développement conditionné par le maltose ordinaire est le plus intense de tout le groupe (environ 7 fois plus fort que le saccharose).

La différence entre le maltose ordinaire et le maltose pur va du simple au double; nous verrons, dans d'autres expériences, que cette différence s'accentue encore; elle est variable, dépend de l'âge et de la qualité des souches ainsi que du degré de purification du maltose dit cristallisé chimiquement pur.

Action des divers maltoses mélangés entre eux.

a) Influence sur le développement végétatif.

Milieu de Coons ordinaire.

Erlenmayer de Jéna de 100 cc. avec 20 cc. de liquide.

Stérilisation $\frac{\text{10 minutes}}{110^{\circ}}$.

Température 20°.

Lumière du jour.

Souches 46 (+), 48 (—), Burgeff, âgées de 15 jours.

Poids sec de la culture après 7 jours :

	1.		2.		3.		4.		5.		6.	
Maltose ordinaire	10		5		5		0		0		0	(acidifié avec 5 gouttes
Maltose pur .	0		0		5		10		5		10	$H^2SO^4 \frac{N}{10}$)
	(+)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—)	(+)	(—)	+)	(—)	(+)	(—)
g.	57,5	49,8	40	37	34	34	5	4,5	1,5	3,5	7,5	5,5

Sur milieu (+) : myc. aérien formé de sporangiophores ténus ; pas de gros sp. verts. pas d'émersion nulle part, faible développement submergé. croûte superficielle avec rares filaments aériens.

Sur milieu (—) : beaucoup de gros sporangiophores verts.

Lorsque le poids est suffisamment élevé, on retrouve le même dimorphisme déjà constaté, poids sec plus élevé en (+) et hauteur du mycélium aérien plus fort en (—).

Différence énorme entre l'action des deux maltoses (dix fois environ).

Légère élévation de l'action du maltose pur par son acidification.

Malgré qu'en 3, il y ait mélange des deux maltoses ramenant la quantité totale à 10 g. %, le poids sec est inférieur à 10 % de maltose ordinaire et même à 5 %, mais de beaucoup supérieur à celui des cultures avec maltose pur. On constate que l'action favorisante du maltose ordinaire (5 g. %) ajoutée à 5 g. de maltose pur, fournit un poids sec très voisin de celui de 10 g. de maltose ordinaire.

b) Influence sur la formation des zygotes.

Comme nous l'avons montré, les affinités sexuelles d'un couple donné se manifestent avec d'autant plus d'intensité que le milieu est plus riche en glucide, la dose minimum d'azote étant présente. Cette observation est valable aussi pour *Phycomyces*.

Nous répétons les expériences avec les deux maltoses.

Milieu de Coons ordinaire avec 3 % d'agar.

Maltose 8 %.

Exp. avec 20 cc. de milieu.
Température 20°.
Lumière du jour.
Souches 46 (+), 48 (—), Burgeff.

Avec maltose ordinaire : 3 exp. donnent respectivement : 250, 102, 150 zygotes avec un certain nombre de copulations abortives, mycélium aérien très développé; dimorphisme habituel du mycélium aérien (pour ce couple) en faveur de (—).

Avec maltose pur : 4 exp. ne donnent aucune zygote quoique il y ait contact des mycéliums superficiels avec une très légère ligne d'inhibition.

Comme cela a été tenté pour le développement végétatif, nous essayons de mélanger les 2 maltoses en vue de préciser leur influence sur la genèse des zygotes.

Milieu de Coons ordinaire avec 3 % d'agar.
20 cc. de milieu par exp.
Stérilisation : $\frac{10 \text{ minutes}}{110^\circ}$.
Température : 25°.
Obscurité.
Souches, 46 (+), 48 (—), Burgeff.

	1		2		3	
Maltose ordinaire . %	10		5		5	
Maltose pur . . . %	0		5		0	
Au 9me jour	400 zygotes env.		300—320		230—240 zygotes	
	nombreuses zygotes abortives					
	large ligne de copulation à peu près égale				ligne de copulation plus étroite	
	fort dimorphisme; nombreux gros sporangiophores verts sur le milieu					
Poids du mycélium aérien arraché (en mg)	(+) 8,9	(-) 24	(+) 9,1	(—) 21	(+) 9	(—) 14

Les cultures 1 et 2 ont exactement la même teneur en carbone; en 2, le nombre des zygotes est sensiblement supérieur à celui de 3, la dose de carbone étant double, mais n'atteint pas celui de 1, culture avec laquelle elle est pourtant isocarbonée. Il semble que l'action favorisante de 5 grammes de maltose ordinaire ajoutés au maltose pur (en 2) favorise la genèse des zygotes sans cependant amener cette culture au niveau de 1, composée uniquement de maltose ordinaire. Une culture témoin, avec malt-agar, fournit une large ligne de zygotes.

Dans une expérience plus complète faite avec des souches fraîches (+ et — de Blakeslee) nous avons fait 11 expériences disposées de la façon suivante :

Maltose ordinaire . .	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Maltose pur . . g. %	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Nombre de zygotes après :											
3 jours	0	0	15	22	48	112	130	190	300	260	320
4 »	0	0	20	40	180	230	300	370	750	680	720
Largeur de la ligne de zygotes en millimètres	—	—	—	—	4-5	6-8	8	8-10	8-10	11	12
	zygotes séparées										

Malgré que la dose de carbone soit identique partout, le nombre des zygotes progresse régulièrement, en fonction de la teneur en maltose ordinaire. Avec 0 et 1 % quelques rares copulations débutantes qui n'arrivent pas au stade des zygotes complètes. Confirmation complète des résultats précédents.

Mais il importe de savoir maintenant comment se comportent les autres sucres quant à leur action sur la formation des zygotes.

Les milieux sont les mêmes que pour le maltose et préparés de la même façon avec des souches de même âge. Température 25 à 26°.

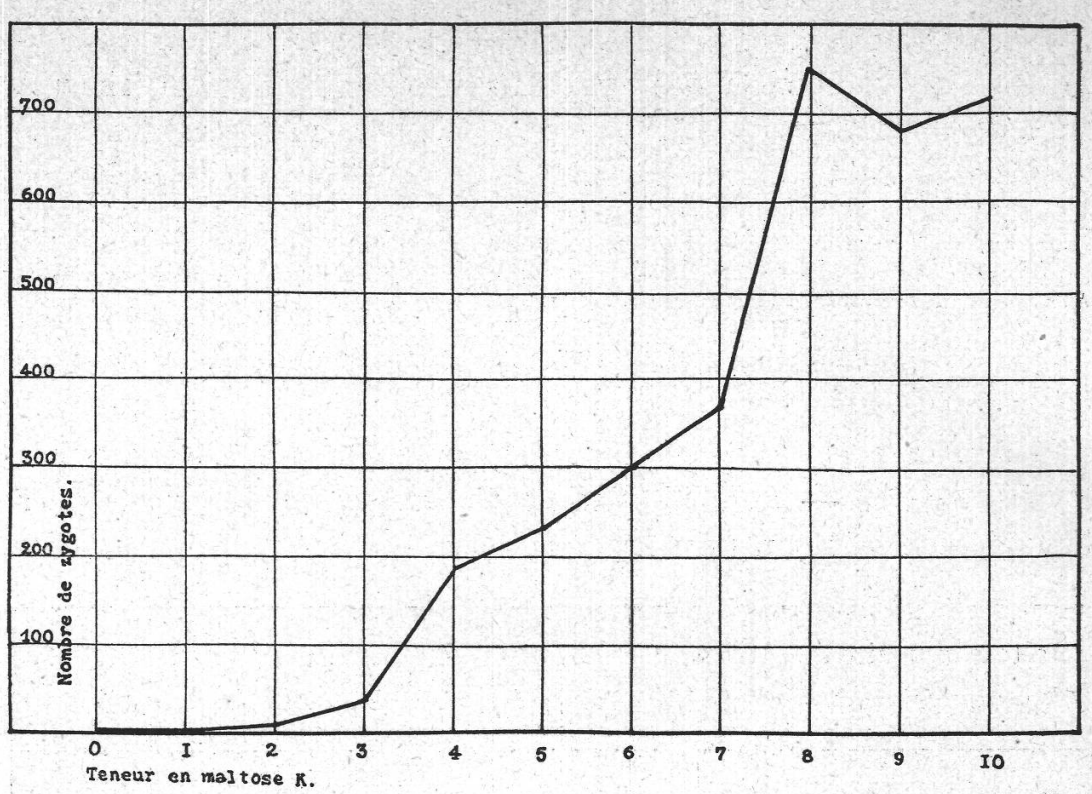

Fig. 2. Formation des zygotes en fonction de la teneur du milieu en maltose Kahlbaum.

Après 6 jours :

10 % Saccharose : (4 exp.) Développement en surface, peu dense; très faible mycélium aérien; pas de ligne de réaction; pas de copulation.

10 % Lactose : (4 exp.) Mycélium aérien assez développé sur le sexe (—). Dans un des vases, très faible ligne de réaction avec quelques copulations débutantes : 1 zygote formée.

10 % Galactose : (4 exp.) Très faible mycélium aérien, aucune ligne de copulation.

10 % Glucose : idem.

10 % Lévulose : (3 exp.) idem.

10 % Raffinose : (1 exp.) Faible mycélium aérien sur le sexe (—); faible ligne de réaction; quelques débuts de copulation qui ne se développent pas.

10 % Mannose : (1 exp.) Très faible mycélium aérien; pas de ligne de réaction.

10 % Rhamnose : (1 exp.) idem.

Dans toutes les expériences les mycéliums des 2 sexes arrivent en contact.

10 % Xylose : (1 exp.) Très mauvais développement, pas de contact entre les 2 mycéliums.

Un contrôle avec malt-agar 3 % fournit d'abondantes zygotes. A part le lactose et le raffinose avec lesquels de très faibles affinités sexuelles se manifestent, aucun des autres sucres, employés pourtant dans les mêmes conditions que le maltose ordinaire, ne fournit une trace de zygotes. Il n'est donc pas exagéré de parler de la position exceptionnelle du maltose ordinaire tant au point de vue du développement végétatif qu'au point de vue de la sexualité; il importe de préciser les propriétés de ce sucre.

Remarquons que les lignes de zygotes obtenues sont aussi larges que celles produites sur malt-agar, mais le nombre des zygotes est plus restreint.

c) Examen des divers maltoses utilisés.

Les maltoses utilisés précédemment sont :

1. Maltose Kahlbaum, Berlin-Adlershof.
2. Maltose chimiquement pur, cristallisé, Schuchardt, Görlitz.

Nous avons fait des essais comparatifs avec :

3. Maltose pur cristallisé de Schuchardt.
4. Maltose cristallisé de Merck.
5. Maltose technique de Merck.

Dans une série comparative, le sucre étant à 10 %, nous constatons que seul le maltose de Kahlbaum fournit des zygotes d'une manière normale, avec un abondant développement du mycélium aérien. Les autres échantillons de maltose sont à peu près inactifs à ce point de vue.

Il y a donc différence du tout au rien suivant l'origine et probablement le mode de préparation de ce dissaccharide. Le maltose technique de Merck suffisant à lui seul à couvrir tous les

besoins du champignon, comme on pouvait le prévoir, sera éliminé des expériences.

Teneur en azote des divers maltoses.

Les différents échantillons de maltose sont analysés par la méthode de Kjeldahl (ordinaire ou microkjeldahl). Les taux sont les suivants :

Kahlbaum ordinaire	$0,_{4974}$ % N.[1]
B. D. H. ordinaire (The British Drug Houses) . .	$0,_{4915}$ % N.[2]
Schuchardt cristallisé chim. pur	inappréciable
Merck cristallisé	idem

Il ressort qu'avec l'échantillon de maltose Kahlbaum, on introduit une quantité appréciable d'azote. (Voir plus loin les teneurs en azote des maltoses que nous avons purifiés.)

Acidité des divers maltoses.

Nous avons eu l'idée d'examiner l'acidité des solutions de maltose seul, qui théoriquement, doivent être neutres. Un essai préliminaire montre que sauf le cristallisé chimiquement pur de Schuchardt qui donne une réaction neutre, tous les autres fournissent, avec de l'eau distillée neutre, une solution plus ou moins fortement acide. Les acidités ont été titrées avec de la soude déci- ou centinormale.

Des quantités croissantes de maltose Merck sont dissoutes dans 50 cc. d'eau distillée.

1	2	3	4	5	6 grammes.
$1,_{65}$	$3,_{70}$	$5,_{50}$	$7,_{30}$	$9,_{10}$ cc.	NaOH N/10

La courbe obtenue est régulière; pour une quantité donnée de maltose, cette acidité peut être calculée. Elle est naturellement liée à la qualité du produit livré et peut très bien varier pour une même fabrique.

Des mesures comparatives donnent les résultats suivants :

Merck technique	$9,_{10}$ cc.	NaOH	N/10
Kahlbaum ordinaire . . .	$9,_{90}$ cc.	idem	N/100
Merck cristallisé . . .	$3,_{20}$ cc.	idem	idem
Schuchardt cristallisé . .	$6,_{10}$ cc.	idem	idem

[1] $4,_{345}$ mgr. correspond à $0,_{02}$ cc. de N. 710 m/m et 23° C.

[2] $4,_{320}$ mgr. correspond à $0,_{02}$ cc. de N. 710 m/m et 23° C. (microkjeldahl).

Le milieu minéral de Coons, sans adjonction de maltose, est lui-même acide; nous avons effectué des mesures comparatives avec le maltose dissous dans ce milieu (non stérilisé). ($MgSO^4$ 1 g. $^0/_{00}$; KH^2PO^4 1 g. $^0/_{00}$; asparagine 2 g. $^0/_{00}$.)

50 cc. milieu seul		50 cc. + 5 g. maltose Kahlbaum
cc NaOH N/100	134 cc.	142 cc.

La différence, 8 cc., se rapproche sensiblement du chiffre fourni par le maltose ordinaire seul.

La présence d'une acidité aussi considérable peut être due soit au mode de préparation, soit à la substance qui fournit le maltose en question. Les diverses fabriques de produits chimiques auxquelles nous nous sommes adressé nous ont donné les réponses suivantes :

1. Kahlbaum : Hydrolyse de la farine de pomme de terre à l'aide de la diastase du malt d'orge.
2. Merck : Action de ferment avec amidon et malt.
3. Schuchardt : Action de la diastase sur l'amidon et cristallisations successives à l'aide d'alcool.

Nous transcrivons exactement les données transmises par les fabriques. Nulle part, on n'utilise l'hydrolyse par acide de l'amidon, mais uniquement l'action de la diastase.

La diastase, par elle-même, en supposant qu'il en reste des traces dans le produit final ne peut fournir à ce dernier son acidité quoiqu'en fausse solution dans l'eau, elle fournisse une réaction assez fortement acide.

50 cc. eau distillée +	1	2	3 g. diastase Merck
	18,6	39	74 cc. NaOH N/100

Malgré cette acidité, la quantité dont on peut supposer la persistance est trop petite pour conférer au maltose son acidité. Mais les diastases ont leur optimum d'action en milieu acide (cf. Funke (1922) pour la diastase *d'Aspergillus*); l'optimum a pu, pour certaines d'entre elles, être fixé entre pH 3,5 et 5,5. Il n'est donc pas impossible que cette acidité créée en vue d'accélérer l'hydrolyse persiste à l'état de traces dans le produit final.

Teneur des divers maltoses en matières minérales.

D'après les renseignements fournis par Kahlbaum, le maltose de cette fabrique contiendrait toujours des petites quantités de sodium, de chlore et parfois de calcium; l'origine de ces éléments pourrait être la porcelaine de la capsule employée; si nous examinons la composition minérale des substances servant de matériel de départ pour la fabrication du maltose, c'est-à-dire le malt et l'amidon, nous trouvons un certain nombre d'éléments qui, à l'état de trace, pourraient persister jusque dans le produit final.

a) Kahlbaum ordinaire . . $0,_{15}$ — $0,_{10}$ — $0,_{095}$ %
b) Merck cristallisé . . . . . $0,_{20}$ %
c) Schuchardt cristallisé . . . . . $0,_{175}$ %
d) Schuchardt cristallisé chimique pur . . $0,_{15}$ %
e) Poulenc pur . . . . . $0,_{05}$ %
f) B. D. H. . . . . $0,_{15}$ %

Teneur variable mais certaine de cendres, dont nous verrons plus loin si elles doivent intervenir dans l'explication de l'action particulière du maltose Kahlbaum et si leur taux peut être modifié par purification de ce sucre.

L'analyse atteste que ces cendres ne contiennent ni cuivre, ni zinc. La question du cuivre a son importance : on sait que certains ions métalliques exercent sur le développement de certains microorganismes, une action catalysatrice; nous l'avons montré pour le cuivre chez *Mucor hiemalis*.

Examen des divers échantillons de maltose en lumière ultra-violette.

L'examen de la fluorescence ultra-violette de substances chimiques donne souvent d'intéressants renseignements quant à leur pureté.

Tous les échantillons de maltoses commerciaux — en poudre fine — donnent sous l'ultra-violet, une teinte violet-blanc éclatante (Poulenc, Schuchardt, Merck, B. D. H.). Par contre le maltose de Kahlbaum, en poudre fine, donne une teinte violet-noirâtre, très différente des précédentes. Cette modification de teinte en U. V. ne nous donne aucun renseignement précis mais

nous indique qu'il y a « quelque chose » de différent entre les maltoses commerciaux cités et celui de Kahlbaum qui pourrait être en relation avec l'activité particulière de ce dernier.

La lampe utilisée est une lampe Hanau, à lumière filtrée (3000—4000 Å.).

4. Recherche d'une hypothèse expliquant l'action particulière du maltose Kahlbaum.

a) Influence possible de l'acidité.

Pour *Mucor hiemalis* (Schopfer, 1928) nous avons montré que l'optimum pour la formation des zygotes se trouve au voisinage du point neutre.

Avec *Phycomyces,* sur un milieu de Coons et en utilisant les solutions tampons de Sörensen, nous constatons qu'un pH de 4 à 5 est favorable à la formation des zygotes (de 300—400); à pH 8, leur genèse est diminuée fortement ou même nulle.

Une expérience analogue est faite en ce qui concerne le développement végétatif. Un milieu de Coons liquide avec 10 % de maltose est alcalinisé avec de la potasse diluée.

Après 5 jours : poids sec du mycélium en mg.

Souches 46 (+), 48(—), Burgeff.

pH	$4,_5$	6	$6,_5$	$7—7,_5$	8
	31	$31,_5$	25	24	13

Il y a donc forte diminution du développement végétatif lorsque l'alcalinité augmente (plus du double en passant de $4,_5$ à 8).

Nous pouvons donc conclure qu'une certaine acidité possède une action accélérante sur la formation des zygotes de *Phycomyces,* mais qu'en aucun cas, elle n'intervient comme facteur principal dans l'action particulière du maltose Kahlbaum. D'autre part, un autre argument défavorable à cette thèse peut encore être déduit : le milieu de Coons est acide; l'acidité supplémentaire amenée avec le maltose est très faible comparée à celle du milieu de Coons : 8 cc. contre 134 cc. NaON N/100. Il est difficile d'admettre qu'une si minime quantité en surplus suffise à déclancher une formation de zygotes aussi intense que celle que la culture avec maltose ordinaire nous montre; l'hypothèse de l'action unique

de l'acidité est donc éliminée. On peut tout au plus dire que l'action favorisante du maltose K. est exaltée par une certaine acidité.

b) Influence possible de l'azote supplémentaire introduit avec le maltose K.

La quantité d'azote jointe au maltose K. semble à première vue suffisante pour augmenter sa ration alimentaire et par ce fait permettre une production plus intense des zygotes. Quelques expériences, effectuées avec des milieux à base de maltose sans action spéciale (Poulenc) *auquel est ajoutée une certaine quantité d'azote supplémentaire,* ne nous ont pas permis d'obtenir une récolte de zygotes beaucoup plus forte que le témoin. D'autre part, le seul fait que le maltose B. D. H. contient autant d'azote que celui de Kahlbaum, et qu'il est sans action particulière, montre bien que ce n'est pas par sa quantité, sa masse, qu'il agit, qu'il ne constitue pas un aliment supplémentaire au sens propre du mot et qu'il faut chercher ailleurs.

c) Influence possible d'une augmentation de la pression osmotique par la présence de matières minérales contenues dans le maltose de Kahlbaum.

Orban (1919) et nous-même (1928) avons montré qu'une augmentation de la pression osmotique peut, par un mécanisme encore inexpliqué, accroître le nombre des zygotes se formant sur un milieu donné. Mais ici, la teneur en cendres est si faible qu'elle ne peut donner lieu à une augmentation appréciable de la pression osmotique.

d) Influence possible d'un élément agissant comme infiniment petit chimique.

Comme nous l'avons indiqué précédemment les constituants des cendres sont surtout : Na., Cl., Ca. Aucun de ces éléments ne possède une activité catalysante analogue à celle des métaux signalés en enzymologie. Nous n'avons pas encore effectué une analyse complète des cendres du maltose de Kahlbaum; nous nous contentons des données fournies par Kahlbaum et des déductions que nous pouvons tirer de la composition minérale du malt et de l'amidon de pomme de terre. Il nous est donc impos-

sible d'éliminer complètement cette hypothèse quoique, a priori, elle semble peu probable. On connaît l'action des traces de manganèse sur la formation des spores chez *Aspergillus*, l'action accélératrice du zinc et du fer, à petites doses sur la croissance et la respiration *d'Aspergillus* (Raulin); mais l'action dont il est question dans notre cas est d'une nature toute différente : il s'agit d'une influence sur les mycéliums de deux sexes et non pas sur le métabolisme global, mais sur le moment particulier du métabolisme en relation avec le déclanchement des affinités sexuelles. Dans une série d'expériences nous avons calciné 50 g. de maltose Kahlbaum; les cendres obtenues sont ajoutées en proportions variables à des milieux à base de maltose purifié sans action spéciale. Dans un seul cas, nous avons obtenu une très faible formation de zygotes qui n'est en aucun cas comparable avec ce que l'on obtient en utilisant le maltose K. On ne peut invoquer l'action d'un catalyseur métallique, du moins à l'état dans lequel il se trouve dans les cendres du maltose.

Nous laissons donc cette hypothèse de côté pour le moment.

e) Action possible d'une trace de diastase.

Des renseignements confidentiels fournis par la maison Kahlbaum, il résulte que la persistance d'une trace de diastase *ayant gardé son activité*, est possible. Mais le seul fait que nos milieux sont stérilisés entre 115° et 120°, enlève toute probabilité à l'hypothèse d'une action de la diastase.

f) Présence possible d'une substance active de nature et d'action vitaminiques.

Par élimination, nous en arrivons à cette dernière hypothèse que nous essayerons de justifier. A priori, elle ne paraît pas injustifiable. Cette substance pourrait provenir du malt qui en est riche et persister grâce à la température assez basse à laquelle les opérations d'hydrolyse sont effectuées au cours de toute la préparation du maltose jusque dans le produit final. Elle serait de nature organique[1] et azotée et constituerait au moins une fraction de l'impureté azotée que nous avons trouvée jointe au maltose K. Elle serait très thermostable, puisque son action per-

[1] Puisque détruite par la calcination.

siste après une stérilisation à 120°. Malgré une certaine confusion et une indiscutable contradiction, qui existent entre les travaux qui ont traité de l'action de substances actives sur les micro-organismes (bactéries et champignons), cette action est certaine. S'agit-il de vitamines aussi caractérisées — si l'on peut dire — que celles qui agissent sur les animaux supérieurs ? On ne peut l'affirmer; dans certains cas, il s'agit, semble-t-il, de la même substance, dans d'autres, elle paraît dissemblable. L'étude de l'impureté jointe au maltose K. permettra peut-être d'apporter un éclaircissement à la question.[1]

Avant d'effectuer l'étude de cette impureté supposée, nous avons fait agir quelques substances connues qu'on pouvait à priori faire intervenir.

Hordénine. A part les substances banales, on sait que le germe de malt contient des quantités appréciables de cette amine (cf. l'analyse de Yoschimura, 1911). On peut supposer que le malt intervenant dans la fabrication du maltose, une trace de cette amine persiste jusque dans le produit final en lui conférant une activité particulière.

Milieu de Coons ordinaire avec 10 % de maltose Merck. Adjonction de sulfate de hordénine (Hoffmann-Laroche) en petite quantité.

Témoin Kahlbaum 2 essais	Merck témoin 2 essais	Merck + hordénine non stérilisé 2 essais	Merck et hordénine — stérilisé
Large ligne de zygotes, fort dévelop. végét.	Zygotes 2—2 Faible ligne de réaction	Zygotes 12—8 Faible dévelop. du mycélium aérien	Zygotes 13

[1] Notre hypothèse nous paraît plausible par le fait que Pringsheim indique récemment une méthode de préparation du maltose qui donnerait, paraît-il, un rendement de 100 %; il s'agit de l'adjonction à la fécule et à la diastase du malt d'orge, de ce que l'auteur appelle : le complément-levure (Hefe complément); s'agit-il, peut-être, d'un corps de nature vitaminique permettant à l'action diastasique de se manifester plus complètement ? Si la fabrique Kahlbaum — qui ne nous a pas renseigné sur ce point — emploie la méthode de Pringsheim, le problème serait résolu; une substance active de la levure, persistant dans le maltose, serait la cause de son activité particulière.

Conclusion : Dans les conditions de nos expériences, la hordénine est sans action.

Des essais effectués avec d'autres amines : tyramine, chlorhydrate et glucosamine, de bétaïne, de choline, donnent les mêmes résultats négatifs : absence de zygotes, très faible développement végétatif. La bétaïne semble avoir une action toxique : les cultures qui en contiennent une petite quantité ne donnent aucune germination de spores.

* * *

(La deuxième partie et la bibliographie de ce mémoire paraîtront dans le prochain fascicule du bulletin.)