



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

COMMENTARII

Vol. I

N. 3

ALDO CASTELLANI

NOUVELLES OBSERVATIONS SUR L'IDENTI-
FICATION MYCOLOGIQUE DU SACCHAROSE
ET DE L'INULINE, SUBSTANCES NON REDUC-
TRICES

EX AEDIBVS ACADEMICIS IN CIVITATE VATICANA



PONTIFICIA
ACADEMIA
SCIENTIARVM

NOUVELLES OBSERVATIONS SUR L'IDENTIFI- CATION MYCOLOGIQUE DU SACCHAROSE ET DE L'INULINE, SUBSTANCES NON RÉDUC- TRICES (*)

ALDO CASTELLANI

Académicien Pontifical

SUMMARIVM — Per experimenta affirmat Auctor omnem substantiam quae fermentari neque minui possit vi boleti *Candidae tropicalis* Cast. (stipitis A) ex saccharosio constare. Si, contra, vi boleti *Candidae Macedoniensis* Cast. utamur, inulinam obtinemus.

Il y a bien longtemps, en 1917, j'ai décrit dans le *British medical Journal* (29 décembre), avec la collaboration du Dr. Frank E. TAYLOR, une série de méthodes microbiologiques pour la recherche et l'identification d'un assez grand nombre de sucres et autres glucides Fehling-réducteurs ou non Fehling-réducteurs. Jusqu'à cette époque, le glucose était la seule substance pour l'identification de laquelle on employait une méthode mycologique: la fermentation par la levure de boulanger (levure de bière) était considérée comme spécifique pour ce sucre. Il est intéressant de noter que cette opinion, bien qu'erronée, se trouve encore dans plusieurs ouvrages modernes de biochimie médicale. La levure de boulanger, en effet, aït fermenter non seulement le glucose, mais encore constamment le

(*) Note présenté le 27 octobre 1961 au cours de la Session Plénière de l'Académie Pontificale des Sciences.

lévulose et le mannose, presque constamment le maltose, souvent le galactose et le saccharose, et occasionnellement le lactose.

Récemment, un biochimiste bien connu m'a conseillé de reprendre l'étude du sujet dans le but de rendre moins laborieuses et plus pratiques mes anciennes méthodes.

S'il est vrai que la chromatographie, si simple, a rendu inutiles beaucoup de mes anciens procédés, il ne faut pas oublier cependant que, comme l'a écrit si justement Anne-Marie STAUB, l'identification définitive d'un sucre ne peut pas se faire sur la seule valeur d'un R_f , ou par l'utilisation des révélateurs.

Dans la présente Note, je me limiterai à traiter brièvement de la détermination mycologique du saccharose et de l'inuline. J'emploie le terme mycologique *sensu lato* pour indiquer non seulement l'emploi des champignons, mais encore celui des bactéries.

IDENTIFICATION MYCOLOGIQUE DU SACCHAROSE MÉTHODE RECOMMANDÉE

La méthode la plus simple et la plus pratique est la suivante (il s'agit en réalité d'une méthode chimico-mycologique):

La substance à déterminer, en solution, est éprouvée avec le FEHLING ou le BENEDICT. Si la réaction est positive, la substance ne peut pas être du saccharose puisque ce sucre est non réducteur, et il est alors inutile de continuer l'investigation. Si la substance est non réductrice, on en prépare une solution à 1 p. 100 dans de l'eau peptonée comme on en trouve dans tous les laboratoires de bactériologie (n'employer jamais du bouillon de viande qui peut contenir des traces de glucose). La solution, après stérilisation (une ébullition d'une demi-minute est suffisante en pratique et n'altère pas la structure des glucides usuels) est placée dans un saccharimètre stérilisé ou

dans un simple tube de verre stérile, contenant de préférence un petit tube de Durham pour capter le gaz. On ensemence avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre, ou le tube, est placé à l'étuve à 35°-37° C. S'il y a fermentation, on peut conclure que la substance est très probablement du saccharose. Pourquoi? L'explication se lit facilement sur le tableau des propriétés fermentaires des champignons et bactéries employés dans mes méthodes.

Parmi les très nombreuses substances étudiées: glucides, alcools, etc. (les substances mentionnées sur le tableau ne représentent qu'une fraction d'entre elles), seuls le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose fermentent avec formation de gaz sous l'influence de *C. tropicalis* souche A. Une substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être ou du glucose, ou du lévulose, ou du mannose, ou du maltose, ou du galactose, ou du saccharose. Mais si elle avait été du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose, du galactose elle aurait réduit le Fehling et le Benedict. Il ne reste pratiquement qu'une seule possibilité: il s'agit de saccharose. Ce raisonnement peut être résumé par la formule mycologique, ou plus exactement chimico-mycologique, suivante:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Fehling, Benedict} \quad . \quad . \quad . \quad 0 \\ \text{Candida tropicalis} \quad . \quad . \quad . \quad + \end{array} \right\} = \text{Saccharose}$$

En employant des saccharimètres gradués, on peut développer des méthodes quantitatives.

MÉTHODES STRICTEMENT MYCOLOGIQUES

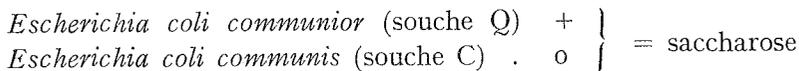
La méthode que j'ai recommandée est en réalité une méthode chimico-mycologique. S'il l'on désire avoir recours à des méthodes mycologiques *sensu stricto* il y en a plusieurs. J'en mentionnerai deux.

1° — Une solution à 1 p. 100 de la substance à déterminer est préparée en eau paptonée et après stérilisation (ébullition d'une demi-minute) est distribuée en deux saccharimètres, ou deux tubes, contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n. 1 est ensemencé avec *Candida tropicalis*, et le saccharimètre ou le tube n. 2 avec *Salmonella schottmuelleri*. On les place à l'étuve à 35-37° C. S'il y a fermentation avec *C. tropicalis* et pas de fermentation avec *S. schottmuelleri*, on peut conclure que selon toute probabilité, il s'agit de saccharose. On en trouve l'explication sur le tableau des fermentations.

Candida tropicalis produit une fermentation gazeuse seulement dans le glucose, le lévulose, le mannose, le maltose, le galactose, le saccharose. Notre substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être l'un de ces six glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du maltose ou du galactose, elle aurait été fermentée aussi par *S. schottmuelleri*. Il reste donc une seule possibilité: ce doit être du saccharose.

$$\left. \begin{array}{l} \textit{Candida tropicalis} \quad . \quad . \quad . \quad + \\ \textit{Salmonella schottmuelleri} \quad . \quad 0 \end{array} \right\} = \text{saccharose}$$

2° — Une portion de la solution de la substance est ensemencée avec *Escherichia coli* var. *communior* (souche Q) et une autre portion avec *Escherichia coli* var. *communis* (souche C). S'il y a fermentation avec *communior* et non avec *communis*, il s'agit de saccharose. La raison en est que les deux souches attaquent les mêmes substances à l'exception du saccharose, qui est fermenté par *communior* (souche Q) et non par *communis* (souche C).



RECHERCHE ET IDENTIFICATION DU SACCHAROSE DANS UN MÉ-
LANGE CONTENANT UN OU PLUSIEURS SUCRES RÉDUCTEURS
SUIVANTE: GLUCOSE, LÉVULOSE, MANNOSE, MALTOSE, GA-
LACTOSE

La solution du mélange (elle est Fehling et Benedict positive) est inoculée avec *Escherichia coli communis* (souche C), qui ne touche pas le saccharose tandis qu'elle fermente les sucres réducteurs mentionnés (et de nombreuses autres substances). Si après épuisement complet par cette souche le liquide est fermentescible par *Candida tropicalis*, on peut conclure que le mélange contenait du saccharose.

Explication — Le liquide ayant été épuisé complètement par *Escherichia coli* var. *communis* ne contiendra plus aucun des sucres réducteur mentionnées, et il sera Fehling et Benedict négatif. Si ce liquide est capable d'être fermenté par *Candida tropicalis*, cela indique la presence de saccharose puisque, en pratique, le saccharose est la seule substance fermentescible par *Candida tropicalis* à part le glucose, lévulose, mannose, maltose, galactose (voir tableau des fermentations).

Le saccharose donc peut être facilement déterminé par des méthodes mycologiques. Le procédé le plus simple, si l'on au préalable que la substance à identifier est non réductrice, est l'emploi du champignon *Candida tropicalis* (souche A). En pratique, toute substance non réductrice capable d'être fermentée par *Candida tropicalis* est du saccharose, autrement dit le champignon *Candida tropicalis* est spécifique pour le saccharose, parmi les substances non réductrices.

TABLEAU I. — ACTION FERMENTAIRE SUR LES GLUCIDES ET AUTRES SUBSTANCES DE QUELQUES CHAMPIGNONS ET BACTÉRIES

	Glucose	Lévitose	Mannose	Mallose	Galactose	Lactose	Arabinose	Rhamnose	Xylose	Saccharose	Inuline	Raffinose	Dextrine	Amiton	Glycérol	Esythritol	Adonitol	Dulcitol	Mannitol	Sorbitol	Salicine	Amygdaline	Inositol	Créatine	Ac. Urique	Glycouronate	Ac. Salicy-	Imrique	Ac. Homogé-	ntistique							
<i>Candida krusei</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
<i>Candida albicans</i> (Robin) var. <i>pinoyi</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
<i>Candida albicans</i> (Robin) var. <i>metalondinensis</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
<i>Candida tropicalis</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
<i>Candida pseudotropicalis</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
<i>Candida macedoniensis</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>Candida Guillermondi</i> (Cast.) [Souche A.]	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Proteus morgani</i> (Cast. & Chalm.) [Souche A.]	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Salmonella schottmueleri</i> (Winslow et al.) [Souche M]	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Escherichia coli</i> (Migula) var. <i>Communis</i> (Auctores) [Souche C]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Escherichia coli</i> (Migula) var. <i>Communior</i> (Auctores) [Souche Q]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+ = Fermentation avec production de gaz. 0 = Absence de fermentation (il n'est tenu aucun compte d'une simple acidité).

IDENTIFICATION MYCOLOGIQUE DE L'INULINE

Il est peut être opportun de dire quelques mots sur la détermination mycologique de l'inuline, son emploi dans le « Clearance Test » pour mesurer la filtration glomérulaire ayant provoqué un vif intérêt.

Dans le *Journal of Biochemistry* (1922, 16, 655-658) j'ai publié avec le Dr. F.E. TAYLOR, plusieurs méthodes mycologiques pour l'identification de cette substance. Récemment, je les ai modifiées et simplifiées. Je me bornerai à décrire brièvement l'une d'elles, strictement mycologique et la plus simple.

On fait une solution a 1 p. 100 dans l'eau paptoné de la substance à déterminer et, après stérilisation (ébullition une demi-minute), on la répartit dans deux saccharimètres ou deux tubes stériliés contenant chacun un petit tube de Durham. Le saccharimètre ou le tube n. 1 est ensemencé avec *Candida macedoniensis* (Souche A), et le saccharimètre ou tube n. 2 avec *Candida tropicalis* (Souche A). On les place à l'étuve à 35°-37°. S'il y a fermentation avec production de gaz avec *C. macedoniensis* et non avec *C. tropicalis*, on peut conclure que, selon toute probabilité, il s'agit de l'inuline. L'explication se lit facilement sur le tableau des fermentations. *C. macedoniensis* provoque la fermentation gazeuse des glucose, lévulose, mannose, galactose, saccharose et inuline seulement. Notre substance ayant été fermentée par ce champignon doit donc être l'un de ces glucides. Mais si elle était du glucose, du lévulose, du mannose, du galactose ou du saccharose elle aurait été fermentée aussi par *C. tropicalis*. Il reste une seule possibilité: ce doit être de l'inuline.

$$\left. \begin{array}{l} \textit{Candida macedoniensis} \quad . \quad + \\ \textit{Candida tropicalis} \quad . \quad . \quad 0 \end{array} \right\} = \textit{inuline}$$

IDENTIFICATION DE L'INULINE DANS UN MÉLANGE CONTENANT UNE OU PLUSIEURS DES SUBSTANCE SUIVANTES: GLUCOSE, LÉVULOSE, MANNOSE, MALTOSE, GALACTOSE, LACTOSE ARABINOSE, RHAMNOSE, XYLOSE, SACCHAROSE, RAFFINOSE, GLYCEROL, DULCITOL, MANNITOL, SORBITOL, SALICINE

Le mélange en solution est inoculé, suivant la technique déjà décrite, avec *Escherichia coli* var. *communior* souche Q. Si, après épuisement par cette bactérie, le liquide est encore fermentescible par *C. macedoniensis*, on peut conclure que le mélange contenait de l'inuline. L'explication est donnée par le tableau des fermentations. Naturellement il faut prendre la précaution d'employer des souches d'*E. coli* var. *communior* et de *C. macedoniensis* qui ont à peu près la même pouvoir fermentaire.

Inulinurie — L'inulinurie spontanée n'existe pas, mais quand on fait un « Inulin Clearance Test », l'inuline apparaît dans l'urine. Si l'urine est fermentescible par *C. macedoniensis* et non fermentescible par *C. tropicalis* ceci indique la présence d'inuline.

Technique — 16 cm³ d'urine sont placés dans un tube; il est avantageux d'y ajouter 4 à 8 cm³ d'eau peptonée pour faciliter le développement des microorganismes. Après ébullition d'une demi-minute on répartit le liquide dans deux saccharimètres ou deux tubes avec petit tube de Durham. Le saccharimètre ou tube n. 1 estensemencé avec *C. macedoniensis*, le saccharimètres ou tube n. 2, avec *C. tropicalis*. On les place à l'étuve à 35°-37° pour 3 jours. S'il se produit une fermentation avec gaz dans le tube n. 1 et pas de fermentation dans le tube n. 2, on peut conclure que, selon toute probabilité, l'urine contenait de l'inuline. En employant des saccharimètres gradués, on peut mettre au point des méthodes quantitatives.

Conclusion — Le saccharose et l'inuline substances non-réductrices, peuvent être facilement mises en évidence par des méthodes que toute substance non réductrice capable d'être fermentée par *Candida tropicalis* (souche A) est du saccharose, ou, on autres mots, le champignon *Candida tropicalis* (souche A) est spécifique pour le saccharose parmi les substances non réductrices.

On peut aussi affirmé en pratique que toute substance fermentescible par *Candida macedoniensis* et non par *Candida tropicalis* est l'inuline.

BIBLIOGRAPHIE

CASTELLANI A. et TAYLOR F.E., *Brit. Med. J.*, 1917, 2, 855.

STRAUB A.M., *Techniques de laboratoire*, p. 792; Masson et Cie., édit., Paris, 1954.

Je serai heureux d'envoyer des cultures de *Candida tropicalis* (souche A) et des autres champignons et bactéries, mentionnés dans le tableau, aux travailleurs de laboratoire qui le désireraient.