



HAL
open science

NOUVELLE TECHNIQUE DU DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B-12 A L'AIDE D'ESCHERICHIA COLI

Claude Calet, Alain Rerat

► **To cite this version:**

Claude Calet, Alain Rerat. NOUVELLE TECHNIQUE DU DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B-12 A L'AIDE D'ESCHERICHIA COLI. Annales de zootechnie, 1954, 3 (3), pp.247-270. hal-00886612

HAL Id: hal-00886612

<https://hal.science/hal-00886612>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NOUVELLE TECHNIQUE DU DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B-12 A L'AIDE D'*ESCHERICHIA COLI*

PAR

CLAUDE CALET

ALAIN RERAT

Assistant à l'I. N. R. A. Assistant à l'I. N. R. A.
Laboratoire de Biochimie de la Nutrition du C. N. R. S., Bellevue.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — Biologie générale d'*Escherichia Coli*.

- A. — Définition.
- B. — Nutrition.
- C. — Cinétique de la croissance.

II. — Physiologie particulière de *E. Coli* 113. 3.

- A. — Durées d'incubation.
- B. — Température d'incubation.
- C. — Préparation de l'inoculum.

III. — Modification de la technique initiale.

- A. — Constitution du milieu.
- B. — Emploi du cyanure.
- C. — Dosage proprement dit.
- D. — Modes d'extraction.

IV. — Méthode pratique.

Conclusions.

Le dosage de la vitamine B-12 peut s'effectuer par différentes méthodes [(1)-(91)-(123)] : physiques [(13)-(23)-(39)-(41)-(48)-(68)-(76)-(122)], chimiques [(6)-(7)-(8)-(36)-(60)] et biologiques. Ces dernières font appel aux êtres supérieurs et aux microorganismes. Elles utilisent le test de croissance du Rat [(43)-(71)-(85)-(96)-(97)], de la Souris (9), du Poulet [(9)-(14)-(15)-(16)-(17)-(18)-(47)-(73)-(108)], des Protozoaires : *Euglena gracilis* [(56)-(90)-(96)], et *Ochromonas* (42) et des bacilles [(25)-(50)-(70)-(81)-(87)-(88)-(89)-(121)]. Fidèles aux techniques microbiologiques, nous n'avons retenu que ce dernier type de dosage.

Successivement, on a utilisé en vue du dosage de B-12 : *Leuconostoc citrovorum* [(9)-(93)-(124)], *Lactobacillus lactis* Dorner ATCC 8000 [(63)-(99)-

(101)-(102)], *Lactobacillus leichmannii* ATCC 318 et 497 [(52 bis)-(64)-(104)-(108)-(110)-(111)], *Escherichia coli* 113-3 [(5)-(10)-(22)-(49)-(58)]. D'après SHAW (98), GREENE et col. (46), SKEGGS et col. (103), *Lactob. lactis*, comme *Leuc. citrovorum*, donne des réponses irrégulières et sa sensibilité vis-à-vis de la B-12 est variable selon les conditions du milieu. *Lactob. leichmannii* n'est utilisable que pour des doses relativement importantes de vitamine de l'ordre de 20 m γ /cm³ (11). De plus, tous les bacilles lactiques transforment la thymine en thymidine qui agit comme facteur de croissance [(9)-(52 bis)-(63)-(99)-(103)-(105)-(119)-(120)-(124)].

Pour ces raisons, notre choix s'est porté sur *Escherichia coli* dont la sensibilité est grande (0,5 m γ /cm³) et l'utilisation relativement facile.

Le but de cette étude est la mise au point d'une technique nouvelle, dérivée de celle de BURKHOLDER (10) et modifiée dans les modalités opératoires.

Nous en rappelons le principe général : il consiste à mesurer la réponse de croissance à la vitamine B-12 d'*E. coli* 113-3, cultivé sur un milieu contenant tous les métabolites indispensables sauf B-12. Cette souche a été obtenue par sélection de cultures traitées aux U. V. de *E. coli* W ATCC 9 637 (27).

Les essais que nous avons tentés avec la méthode de BURKHOLDER ne nous ont pas satisfaits et nous ont donné des résultats inconstants.

Dès lors, il nous a paru indispensable de faire l'analyse des facteurs pouvant influencer le dosage, afin de standardiser les différentes phases opératoires : constitution du milieu de base, inoculation, incubation, extraction de la vitamine B-12 des échantillons, etc... Nous avons été conduits à étudier tout d'abord la biologie d'*E. coli* en général.

I. — BIOLOGIE GÉNÉRALE D'ESCHERICHIA COLI

A. — Définition

Famille : Enterobactériaceae.

Tribu : Eschericheae.

Bâtonnet Gram négatif, asporulé, mobile, fermentant le glucose et le lactose avec formation d'acide et de gaz.

Aérobic facultatif.

Test au rouge de méthyle positif.

B. — Nutrition

Ce microorganisme a très peu d'exigences nutritives puisqu'il se développe sur une solution peptonée salée. En 1923, KOSER (65) préconise le milieu simple suivant :

PO ₄ H ₂ NH ₄	1 g
Sucre	2 g
NaCl	5 g
SO ₄ Mg ₂ 7 H ₂ O	0,2 g
PO ₄ HK ₃	1 g
Eau qqs	1 000 cm ³

— Les sources d'énergie convenables pour *E. coli* sont très variées. Beaucoup de glucides lui conviennent, mais l'adonitol, l'inuline, la pectine sont rarement utilisés. Le cellobiose et l' α -méthylglucoside ne sont pas fermentés [(30)-(31)-(32)-(40)-(82)-(83)-(113)]. Les sels de sodium des acides organiques, tels que acide acétique, malique, succinique, lactique, mucique, glycérique sont de bons aliments. Mais les acides valérianique, isovalérianique, caproïque, oxalique, salicylique ne sont pas utilisés. L'acide propionique provoque même un léger ralentissement de la croissance (67).

Le problème important est celui de l'acide citrique qui a un effet toxique sur les aerobacter, mais non sur certaines colonies d'*Escherichia*. KAUFFMANN (61) montre que, parmi les variétés microbiennes dites « citrate + » existent des *Escherichia*. MITCHELL et LEWINE, en 1938 (75) établissent les mêmes classifications des souches.

— On peut employer comme source d'azote des substances plus ou moins complexes comme les sels d'ammoniaque, les aminoacides, l'uracile et l'indol. Mais l'acide urique, l'hydantoïne, l'urée et les acides nucléiques de la levure ne sont pas utilisés [(66)-(75)]. DOOREN DE JONG (33) classe les produits azotés de la façon suivante :

<i>E. Coli</i>		
Utilise bien	Utilise peu	N'utilise pas
Urée	Allantoïne	Méthylurée
Arginine	Guanine	Ethylurée
Ac. Parabanique	Ac. urique	Thiourée
Alloxane		Guanidine
Alloxanthine		Créatine
Xanthine		Créatinine
		Ac. barbiturique

Il faut signaler un grand besoin d'asparagine (72).

— Parmi les besoins minéraux, le rôle des cations est difficile à établir (38). On sait cependant que le Fer, le Cobalt, le Cadmium, le Plomb, l'Aluminium, le Mercure sont toxiques à certaines doses (35) bien que le Fer, à doses faibles, favorise les diastases déshydrogénantes (115). Il faut noter les besoins importants en Magnésium (125).

L'utilisation des anions varie avec la nature de ceux-ci. En général, l'action bactéricide des acides dépend de leur force (un acide étant d'autant plus bactéricide qu'il est plus ionisé). Pour les acides organiques, qui sont généralement faibles, vient s'ajouter une action propre du radical [(21)-(37)-(69)-(77)-(83)-(86)-(100)]. Quoi qu'il en soit, l'action favorisante des anions diminue dans l'ordre suivant : sulfate > tartrate > acétate > chlorure > chlorate > bromure > citrate > nitrate > oxa-

late (35). Le problème du citrate a déjà été considéré. Le fait que l'acétate, ainsi que l'acide acétique, ne sont pas défavorables à *E. coli* nous sera fort utile dans la suite des opérations du dosage.

— Les besoins *vitaminiques* de *E. coli* sont très faibles. Il fait la synthèse de riboflavine, des coenzymes I et II, de biotine. Il suffit de $5,8 \cdot 10^{-8}$ M d'acide paraaminobenzoïque dans le milieu pour combattre les effets des sulfamides. A doses faibles, les auxines favorisent sa croissance (4).

— Par ailleurs, il a été montré qu'*E. coli* résiste 24 heures à l'alcool à 25°, mais succombe aux vapeurs d'éther et de formol [(12)-(76)]. Les cétones sont de faibles germicides (112). Ces résultats sont intéressants, car ils permettent l'emploi d'alcool ou d'acétone pour faire l'extraction des échantillons.

Toutes ces données nous ont aidés à orienter nos investigations et ont facilité l'étude particulière du mutant 113-3, en vue du dosage de la vitamine B-12.

C. — Cinétique de la croissance

En général, la croissance microbienne est caractérisée par quatre phases. La phase de *latence*, définie par WINSLOW (114), correspond à des changements métaboliques au cours desquels les cellules s'adaptent à leur nouveau milieu et se divisent peu. La durée de cette période dépend de la densité microbienne (51), de l'âge de l'inoculum (45), de la nature du milieu dans lequel il est repiqué (117), de la température d'incubation (80). Vient ensuite la phase *logarithmique*, ou phase de multiplication active, qui traduit la croissance proprement dite : son intensité [(3)-(118)] et sa durée [(54)-(57)] dépendent surtout de la température (118). Les deux dernières phases, dites *stationnaire* et de *dégénérescence*, n'intéressent pas cette étude si l'on considère la définition du dosage microbiologique.

La seule partie utilisable du graphique de croissance est la fraction médiane de la courbe en S. Il faut que celle-ci se rapproche le plus possible d'une droite. Pour cela, le temps de latence doit être le plus court, la phase logarithmique la plus étendue et la densité optique finale la plus élevée pour les concentrations de B-12 les plus fortes.

Les caractéristiques d'un bon dosage microbiologique sont en effet : un blanc aussi bas que possible (temps de latence), une fraction médiane de la courbe aussi droite et étendue que possible (phase logarithmique).

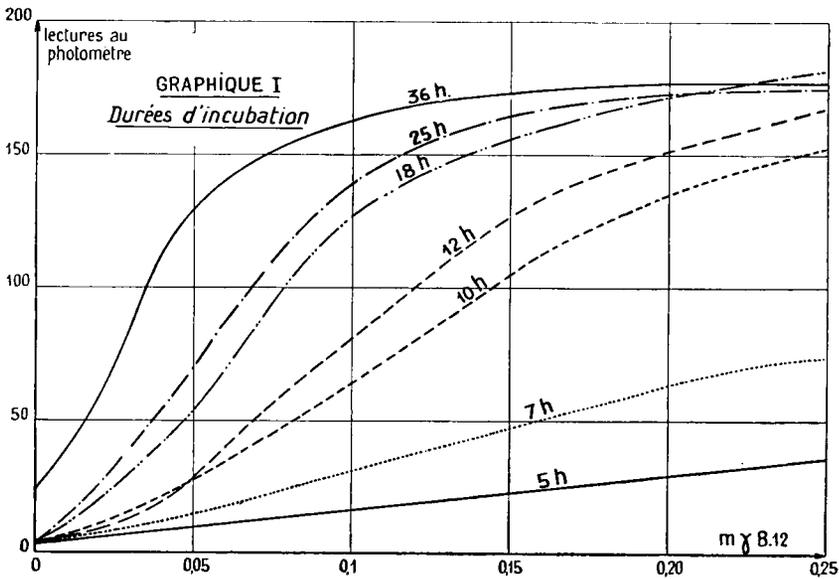
II. — PHYSIOLOGIE PARTICULIÈRE DE *E. COLI* 113-3

En fonction de ces données, nous avons voulu étudier quelle était l'influence des facteurs suivants : durée et température d'incubation, nature de l'inoculum, dans le cas particulier de la croissance de *E. coli* 113-3.

A. — Durées d'incubation

Avec un même inoculum et à même température, nous avons étudié l'influence du temps d'incubation : 5 h., 7 h., 12 h., 15 h., 18 h., 20 h., 25 h., 36 h., sur la forme des courbes de croissance et sur le résultat du dosage des échantillons.

Le graphique I montre que, pour des temps très courts, la forme de la courbe est une droite de très faible pente. Bien que les réponses de croissance soient proportionnelles aux quantités de B-12 apportées, elles demeurent toujours très faibles. Le manque de sensibilité des courbes fait diminuer la précision dans les dosages.



A partir de 12 heures et au delà, le sommet de la courbe est le même quelle que soit la durée d'incubation, mais il est atteint pour des concentrations de vitamine d'autant plus faibles que les temps sont plus longs. Cela revient à dire que la phase logarithmique est d'autant plus importante que le temps d'incubation est plus court et c'est ce que nous retiendrons.

Si l'on étend les recherches au domaine analytique, on voit que les résultats des dosages, calculés d'après les courbes standard correspondantes, sont très variables. Le tableau I montre qu'on trouve la valeur moyenne la plus élevée avec le temps d'incubation le plus court (5 heures), mais la courbe correspondante manque de précision par son défaut de sensibilité. De plus, pour des durées d'incubation aussi réduites, on peut se demander si le microorganisme a eu le temps de sortir de sa phase de

latence pour entrer dans la phase logarithmique, phase qui est la seule à signifier quelque chose pour le calcul des résultats.

TABLEAU I

Résultats en γ par g de foie frais

Durée d'incubation	Moyennes	Extrêmes
5 heures	0,42	0,415-0,45
10 heures	0,33	0,31-0,34
15 heures	0,34	0,32-0,35
20 heures	0,38	0,33-0,40

A partir de 12 heures et au delà, pour des concentrations qui correspondent strictement à la phase logarithmique, les résultats sont très satisfaisants. Toutefois, pour les temps très longs, le palier est atteint trop rapidement pour rendre la courbe utilisable (durée d'incubation au-dessus de 18 h.).

Ainsi, les temps d'incubation qui donnent les résultats les plus fidèles et pour lesquels la portion utile de la courbe est la plus large, correspondent à des durées s'étendant de 12 à 17 heures. Dans ces limites, bien que les courbes standard varient dans leur forme, les résultats, eux, restent invariables. Cela revient à dire que l'on peut choisir sans inconvénient une de ces durées, à la condition qu'elle soit rigoureusement identique pour l'extrait et le standard.

Une première conclusion est que la durée d'incubation préconisée par BURKHOLDER gagnerait à être légèrement réduite.

B. — Températures d'incubation

La bibliographie [(3)-(57)] indique que la vitesse de croissance *E. coli* est optima à 37°. Rien ne prouve que, pour le mutant utilisé, il en est de même. D'ailleurs, si nous construisons, à cette température, la courbe de croissance de l'organisme en fonction des concentrations de B-12, nous nous apercevons que, très rapidement, elle atteint un plateau. Dans ces conditions, la phase logarithmique, bien qu'intense, est trop courte pour être utilisable à des fins analytiques. Aussi, en fonction du but recherché, nous avons étudié systématiquement toutes les températures entre 18° et 39°. C'est entre 28° et 30° que la forme de la courbe est la plus satisfaisante.

Le graphique II montre, en effet, qu'à ces températures la croissance maximum est élevée et la partie utilisable de la courbe très étendue, puisque celle-ci ne présente pratiquement pas de plateau.

D'un autre côté, comme l'indique le tableau II, les moyennes des résultats des dosages des échantillons sont sensiblement les mêmes aux différentes températures, mais la variabilité des résultats est plus faible à 30°.

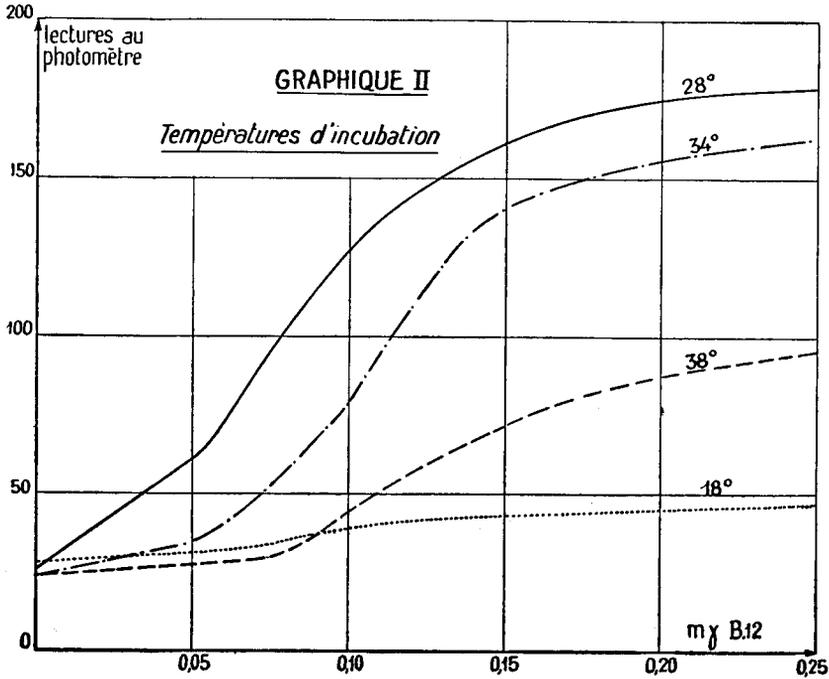


TABLEAU II

Résultats en γ par g de foie frais

Températures d'incubation	Moyennes	Extrêmes
18°		Résultats impossibles à calculer (voir le graph.)
28°	0,32	0,30-0,34
30°	0,35	0,34-0,36
36°	0,30	0,26-0,35
39°	0,29	0,26-0,30

C. — Préparation de l'inoculum

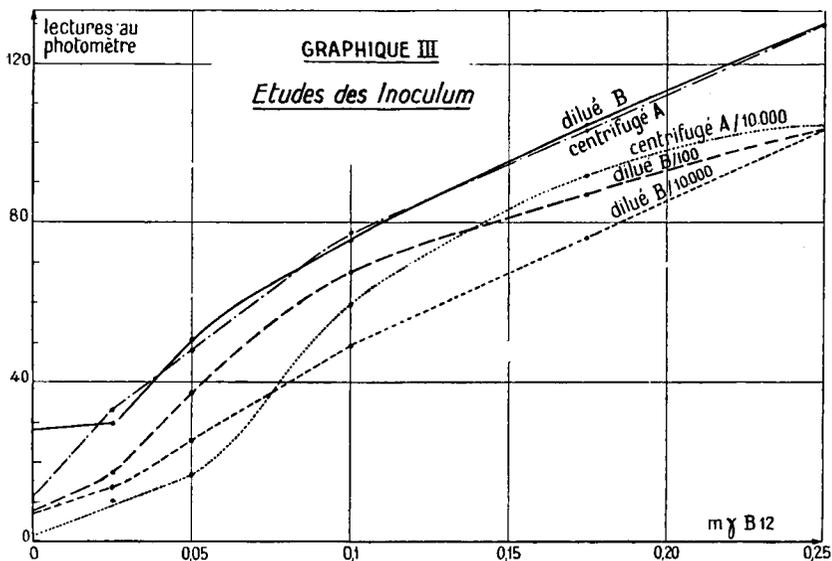
Il est certain *a priori* que les conditions d'inoculation sont susceptibles d'influencer notablement les courbes de croissance.

L'inoculum, dans la méthode originale, est préparé sur un bouillon de culture à partir de la souche entretenue sur gélose. Cet inoculum est incubé 10 heures à 37°. On le centrifuge ensuite et on le remet en suspension plusieurs fois dans du sérum physiologique, pour ne garder que les cellules microbiennes. Cette technique, qui est longue et minutieuse, ne va pas sans inconvénient. En effet, CURRAN et EVANS (22) ont montré que les manipulations qui secouent les microorganismes sont néfastes, dénaturent leurs cellules et modifient l'état colloïdal du protoplasme.

Tout porte à croire que les centrifugations suivies de remises en suspension par agitation présentent les mêmes dangers.

Comme le problème consiste à débarrasser des organismes en bon état de tout élément influençant le dosage, nous nous sommes demandés si une simple dilution de l'inoculum ne permettait pas d'atteindre le but cherché.

De fait, pour une même densité microbienne évaluée par turbidité, nous n'avons pas trouvé de différences dans la forme des courbes standard, que l'inoculum soit dilué ou centrifugé (graphique III).



Les moyennes des résultats des dosages calculés à partir des courbes standard correspondantes sont identiques ; mais les réponses sont beaucoup plus variables si l'inoculum est centrifugé que s'il est dilué. Il semblerait que la centrifugation, en dénaturant les microbes, modifie la spécificité de la réponse.

Il fallait rechercher maintenant la densité microbienne la plus favorable. Pour cela, nous avons fait varier les densités optiques des deux types d'inoculum, « dilué » ou « centrifugé », de 1 à 10 000 et les résultats obtenus furent les suivants : (tableaux III et IV).

TABLEAUX III ET IV

Résultats en γ par g de foie frais

Inoculum	Densités optiques	Moyennes	Extrêmes
1° Centrifugés			
A	385	0,30	0,23-0,42
A/10 000	11	0,32	0,22-0,42
2° Dilués			
B	391	0,27	0,22-0,33
B/100	132	0,32	0,30-0,38
B/10 000	13	0,37	0,35-0,39

1° *Courbe standard.* Bien que, pour une même densité microbienne, la courbe standard soit identique avec un inoculum « dilué » ou « centrifugé », la forme de la courbe change dans les deux cas avec la densité optique de l'inoculum. Le graphique III montre que le blanc est d'autant plus élevé et la phase logarithmique d'autant plus courte que les inoculum sont plus forts.

Ainsi, les meilleures sensibilités sont obtenues avec les inoculum faibles.

2° *Extraits.* D'une manière générale, les résultats sont d'autant plus élevés et plus homogènes que les inoculum sont plus dilués. Toutefois, pour les inoculum centrifugés, la variabilité est très grande quelle que soit la dilution, car on apporte beaucoup de formes microbiennes aberrantes.

Ainsi, pour la précision des résultats et pour la commodité plus grande de la technique, nous recommandons d'utiliser des inoculum faibles, préparés au moyen de la simple dilution, dont la turbidité, mesurée à l'électrophotomètre de Meunier, varie entre 10 et 40.

En résumé, en plus du fait que nous avons trouvé quelle était la préparation de l'inoculum la plus facile, tout en donnant le meilleur résultat, nous aboutissons aux conclusions suivantes : en utilisant des quantités microbiennes variables, nous reproduisons les mêmes effets qu'en faisant varier la durée et la température d'incubation.

Par conséquent, le seul fait important en vue d'obtenir tel ou tel type de courbe, est d'avoir dans chaque tube, à un moment déterminé, une concentration microbienne déterminée, en agissant sur trois facteurs :

- la densité de l'inoculum,
- la température d'incubation,
- la durée d'incubation.

Nous donnerons plus loin les conditions pratiques qui permettent d'utiliser au mieux ces trois facteurs.

III. — MODIFICATIONS DE LA TECHNIQUE INITIALE

A. — Constitution du milieu

Nous avons utilisé le même milieu que BURKHOLDER, mais nous en avons modifié les modalités d'emploi. Il est commode, en effet, d'apporter certains des éléments en solution. Mais une des raisons les plus fréquentes d'échecs dans le dosage est que ces solutions s'altèrent ou sont polluées par des microbes ou des moisissures, qui synthétisent la vitamine B-12.

Un bon moyen de les conserver est la stérilisation. Nous avons donc effectué des dosages comparatifs avec un milieu où les éléments étaient apportés frais et un milieu où les éléments avaient été stérilisés. Les résultats montrent que la stérilisation n'a aucun effet nuisible sur les éléments du milieu.

B. — Emploi du cyanure

On sait que la vitamine B-12 ne résiste pas à la chaleur. BURKHOLDER préconise l'apport de thioglycolate de sodium dans le milieu en vue de protéger la vitamine B-12 au cours de la stérilisation. D'autres auteurs [(44)-(79)-(94)-(107)] pensent que certaines substances réductrices la protègent à l'autoclave. SKEGGS et col. (104) ont trouvé que l'acide thiomalique, l'acide thioglycolique, la cystéine, l'acide ascorbique, l'hydrosulfite de sodium et l'acide éthylène-diaminotétracétique avaient une action égale de protection de B-12 vis-à-vis de la chaleur. Enfin, COOPERMANN et col. (19), WIJMEGA (116), ainsi que d'autres auteurs [(17)-(79)-(97)], recommandent le cyanure.

Nous n'avons pas voulu employer le thioglycolate à cause de ses inconvénients pratiques et nous avons étudié les modalités d'emploi du cyanure de potassium.

Il fallait tout d'abord déterminer les doses de cyanure à utiliser. A l'intérieur de certaines limites, elles ne semblent pas jouer sur la courbe standard, mais influencent le dosage des extraits comme le montre le tableau V.

TABLEAU V

Résultats en γ par g de foie frais

Concentrations en cyanure par rapport à B-12	Moyennes	Extrêmes
100 γ /m γ B-12	—	—
4 γ /m γ B-12	croissance inhibée en 24 h	
0,47/m γ B-12	0,32	0,30-0,335
0,04 γ /m γ B-12	0,35	0,29-0,335
	0,28	0,27-0,30

On voit que les teneurs en B-12 d'un échantillon donné apparaissent d'autant plus fortes que les quantités de cyanure sont elles-mêmes plus élevées. Toutefois, des quantités trop importantes de cyanure, de l'ordre de 100 mg par γ de B-12, inhibent la croissance.

Aussi les doses de cyanure recommandables sont-elles de 4 mg par γ de B-12. Il y a, en effet, intérêt à maintenir constant le rapport CNK/B-12. Pour cela, le plus simple est d'inclure le cyanure dans l'extrait et dans la solution étalon.

C. — Dosage proprement dit

a) Solution étalon de vitamine

On la prépare extemporanément. Le mieux est de partir d'une solution concentrée que l'on dilue au moment du remplissage des tubes.

Deux solutions s'offrent :

— Soit travailler avec un milieu rigoureusement constant et pour cela utiliser une solution relativement diluée de vitamine, à la dose de 1 à 5 cm³, le milieu de base étant lui-même concentré deux fois et le tout amené à 10 cm³.

— Soit tolérer une très légère variation de volume par tube et pour cela utiliser une solution dix fois plus concentrée de B-12, à la dose de 0,1 à 0,5 cm³. Le milieu de base lui-même n'a dès lors plus besoin d'être concentré deux fois. Le volume final varie entre 5 et 5,5 cm³. Nous appelons « méthode simplifiée » cette dernière car elle est plus rapide en réduisant d'un tiers le nombre des pipetages.

Les résultats sont identiques dans les deux méthodes.

b) Milieu de base

Il est inspiré de celui de BURKHOLDER et a la composition suivante pour être utilisé dans notre méthode simplifiée :

Citrate neutre de Na	0,5 g	Histidine	100 mg
Sulfate d'ammonium	1 g	Glycocolle.....	100 mg
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O...	0,1 g	Asparagine.....	4 g
Glucose	10 g	Arginine	100 mg
Proline.....	100 mg	Ac. glutamique.....	100 mg
Eau bidistillée qqs.....	1000 cm ³	Tryptophane l (—).....	100 mg

Il est évident qu'en employant la méthode officielle, il faut prendre le même milieu à double concentration.

c) Température et durée de stérilisation

Dans la méthode de BURKHOLDER, les tubes une fois remplis et bouchés avec du coton, sont stérilisés 6 minutes à 120°. Nous avons étudié l'influence des conditions d'autoclavage sur le dosage.

C'est une opération nécessaire, car, outre les possibilités de contamination, l'absence d'autoclavage rend la forme des courbes aberrante et modifie les résultats du dosage (graphique IV).

Pour des durées d'autoclavage variant de 6 à 15 minutes, il n'y a pas de différence, ni dans la forme des courbes, ni dans les résultats. Lorsque le temps dépasse 15 minutes, il se produit une destruction im-

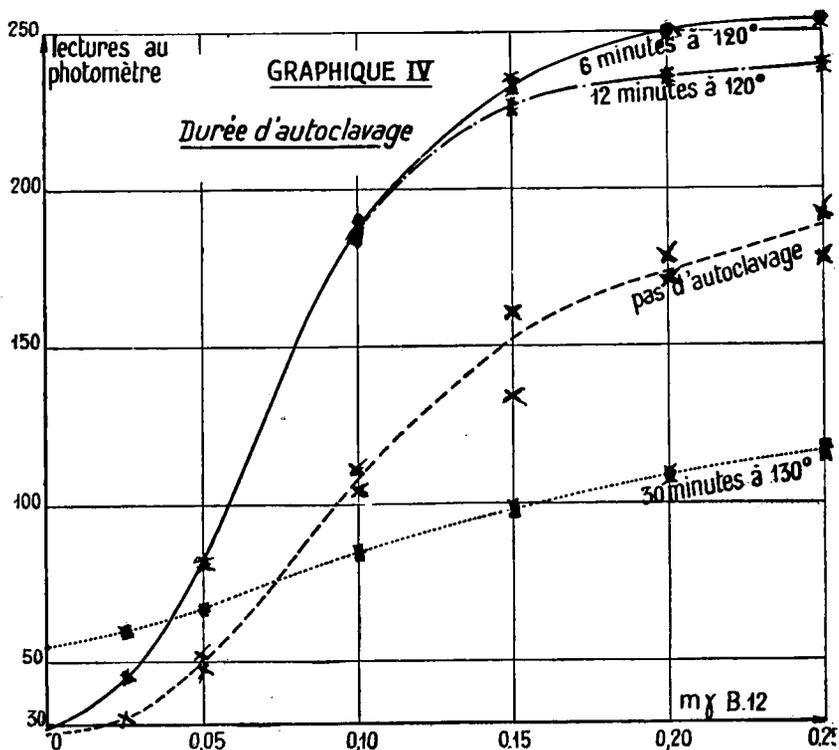


TABLEAU VI

Résultats en γ par g de foie frais

Durées	Moyennes	Extrêmes
Pas d'autoclavage	0,38	0,26-0,47
6 minutes 120°	0,32	0,30-0,33
12 minutes 120°	0,31	0,28-0,34
15 minutes 120°	0,31	0,29-0,35
30 minutes 130°	0,33	0,26-0,39

portante de B-12. Bien que les courbes standard soient encore utilisables (la destruction étant identique pour l'étalon et pour les extraits), elles perdent néanmoins beaucoup de leur sensibilité.

D. — Modes d'extraction

La vitamine B-12 est une substance très soluble dans l'eau et c'est pourquoi la première façon de l'extraire fut une simple mise en solution à l'eau froide.

HOFFMANN et col. (55) préconisent l'eau bouillante. HOEKSTRA et col. (52) extraient la vitamine B-12 en l'autoclavant en milieu aqueux à 120°. Par ailleurs, BACON et col. (2), NOVAK et col. (76), démontrent

que, pour avoir des résultats reproductibles, il faut autoclaver. Enfin, de nombreux auteurs [(20)-(78)-(92)-(93)-(94)] ont préconisé les enzymes protéolytiques pour extraire toute la vitamine.

Nous avons étudié l'influence de ces différents types d'extraction sur le dosage. Nous examinerons donc successivement :

- les extractions à chaud ;
- les extractions à froid.

a) Les extractions à chaud

Nous avons comparé les résultats de l'extraction au bain-marie à 100° et à l'autoclave à 120°. Ce mode d'autoclavage pourrait se faire, soit en milieu aqueux, soit à différents pH en présence de tampon.

Nous avons vu qu'*E. coli* supporte bien un milieu contenant des phosphates et même de l'acétate. Aussi avons-nous étudié les modes d'extraction suivants :

- au bain-marie à 100° ;
- à autoclave à 120° 1/2 heure :
 - soit en milieu aqueux,
 - soit en tampon acide acétique-acétate (pH 4,5),
 - soit en tampon phosphate (pH 4,55) [(phosphate monopotassique M/15),
 - soit en tampon phosphates (pH 5,5) (phosphate monopotassique M/15 : 95,5 p. 100 ; phosphate bipotassique M/15 : 4,5 p. 100).

DANIEL et col. (26) avaient montré que l'extraction à pH 5,5 donnait les meilleurs résultats.

Pour savoir si le corps qui permet l'extraction n'était pas nuisible, soit aux propriétés de B-12, soit au microorganisme, nous avons pris comme référence une solution pure de *vitamine B-12* de titre connu, traitée dans les mêmes conditions.

Après le traitement thermique, les extraits sont filtrés et dilués de façon à fournir un titre voisin de la solution standard. Le tableau VII rapporte à la fois les résultats de dosages dans le foie et les résultats obtenus avec une solution pure de B-12.

TABLEAU VII

Modes d'extraction	Foie frais en γ/g Solution pure à 0,5 $m\gamma/cm^3$	
	—	—
Eau bouillante	0,33	0,49
Autoclavage	0,31	0,50
Autoclavage, acétate, pH 4,5	0,42	0,50
Autoclavage, acétate, pH 4,5 ramené à 7	0,36	0,50
Autoclavage, phosphate, pH 4,55	0,26	0,50
Autoclavage, phosphate, pH 4,55 ramené à 7	0,26	—
Autoclavage, phosphates, pH 5,5	0,25	0,51
Autoclavage, phosphates, pH 5,5 ramené à 7	0,25	0,49

Sur le plan pratique, l'hydrolyse en milieu aqueux donne des extraits qui filtrent mal. L'hydrolyse en milieu acétique fournit un précipité fin qui filtre régulièrement et assez rapidement. L'hydrolyse en milieu phosphate (soit à pH 4,5, soit à pH 5,5) donne un précipité dense, ramassé en gros agglomérats, ce qui permet une filtration extrêmement rapide.

Les valeurs trouvées avec une solution étalon de vitamine B-12 montrent que nos conditions d'autoclavage n'entraînent jamais de pertes ; par contre, elles interviennent quand il s'agit d'extraire la vitamine d'un échantillon. Ici c'est un autoclavage en tampon acétate qui donne les résultats les plus élevés. Il est vraisemblable que les chiffres inférieurs trouvés avec les tampons phosphates sont le fait d'une rétention de vitamine dans le précipité.

Nous retiendrons comme moyen d'extraction à chaud l'usage du tampon acétate à pH 4,5, qu'il est inutile et même nuisible d'élever par la suite à pH 7, étant donné que les pH compris entre 5 et 6 conviennent le mieux à la stabilité de la vitamine B-12.

b) Les extractions à froid

Nous savons qu'*E. coli* n'est gêné ni par des traces d'acétone, ni par des traces d'alcool. Aussi, à la suite de KERESZTEZI (62) et de COMBS (18), avons-nous comparé ces modes d'extraction.

L'extraction à l'acétone correspond à celle utilisée dans le dosage de la vitamine B-12 et des antibiotiques de certains A. P. F. (39 bis). Elle consiste à mettre l'échantillon en milieu chlorhydrique (pH 1,5) dans l'acétone à 60 p. 100 et à le laisser une nuit à la glacière. Le lendemain, on observe une grosse précipitation et après avoir ramené le pH à 4,5 et chassé le solvant, on filtre et on fait la dilution convenable.

L'extraction à l'alcool est encore plus facile, puisqu'elle consiste en une simple mise en suspension dans l'alcool à 66 p. 100.

La filtration des extraits acétonique et alcoolique est excellente, en raison des précipités fins et denses.

Les résultats donnés par l'alcool sont faibles. Ceux donnés à la suite du traitement à l'acétone sont très satisfaisants, que ce soit avec l'échantillon ou la solution pure. Toutefois la technique à l'acétone est longue et l'obligation de chasser le solvant rend la méthode difficile et augmente les risques de perte.

Parmi les différents modes d'extraction décrits, une grande place a été faite aux *diastases* [(29)-(59)-(97)-(109)-(110)]. SCHEID et col. (93) ont montré que l'on extrait deux fois plus de vitamine B-12 au moyen des ferments qui digèrent les tissus. Nous avons étudié de ce point de vue la trypsine, la papaïne, la taka-diastrase et la mylase P. Le tableau VIII rapporte les résultats de différents types d'extraction à froid.

Dans l'ensemble, les valeurs trouvées après action des diastases sont anormalement élevées. Avec une solution qui contient 0,5 m γ /cm³ de B-12, on en dose 0,7 après extraction à la trypsine. Les valeurs trouvées après action d'autres diastases sont moins hautes, mais néanmoins trop fortes. Ces faits tiennent à ce que ces ferments, la trypsine notamment, contiennent eux-mêmes de la vitamine B-12 comme le montrent les dosages directs :

Diastases	Taux de B-12 en γ /100 g
Trypsine	62
Papaïne + taka-diastase	8
Mylase P	8

TABLEAU VIII

Modes d'extraction	Foie frais γ /g	Solution pure à 0,5 m γ /cm ³
Acétone	0,42	0,49
Alcool	0,29	0,59
Trypsine	0,55	0,70
Mylase P	0,48	0,62
Taka-diastase + Papaïne	0,48	0,58

Après ces investigations comparées, le choix d'un mode d'extraction peut porter sur le traitement à chaud en présence de tampon acétate-acétique à pH 4,5 ou sur le traitement par l'acétone.

IV. — MÉTHODE PRATIQUE

Nous sommes en mesure de tirer une application pratique des observations faites sur le plan théorique que nous venons d'exposer. Voici, à ce titre, les éléments d'un essai de normalisation du dosage microbiologique de B-12.

a) Milieu d'entretien des souches

E. coli 113-3 est repiqué sur gélose inclinée dont voici la composition :

Peptone	1,25 g ⁽¹⁾
Extrait de levure.....	0,75 g ⁽²⁾
Gélose	5 g ⁽³⁾
Eau qqs	250 cm ³

On fait bouillir une à deux minutes la peptone et la levure. On filtre et on réchauffe en présence de gélose, on répartit dans des tubes (8 cm³ environ), on stérilise 17 minutes à 115° et on laisse refroidir en inclinant le tube.

(¹) Bacto Peptone Difco standardized
 (²) Difco Bacto Yeast extract deshydrated
 (³) Bacto agar Difco standardized.

On repique la souche, avec une anse de platine tous les 15 jours. Après un jour d'incubation à 37°, on la conserve à la glacière.

b) Préparation des extraits

Nous avons vu que les extractions qui donnent les meilleurs résultats sont :

- celle à l'autoclave en présence du tampon acide acétique-acétate,
- celle à l'acétone à froid.

Outre que la méthode à l'acétone est plus longue et plus délicate, il peut être nécessaire de stocker les extraits avant de pouvoir les doser. La méthode à l'autoclave permet, en plus de l'extraction, de stériliser l'échantillon. A ce stade, à l'abri de la lumière, on peut le conserver deux ou trois mois. C'est pour ces deux raisons que nous préférons la méthode d'extraction à l'autoclave à pH 4,5.

Pour cela, un poids connu d'échantillon contenant environ 0,1 γ de B-12 est mis en suspension dans l'eau bidistillée (10 à 15 fois le poids sec). On ajuste le pH à 4,5 (à l'aide de vert de bromocrésol) en versant 2 cm³ de solution d'acétate 2,5 M et environ 1 cm³ d'acide acétique glacial. Après une demi-heure d'autoclavage à 120°, on amène à 200 cm³ et on filtre. Cette dilution est nécessaire pour arriver à une concentration de B-12 de 0,5 m γ /cm³ qui est comparable à celle de l'étalon.

De plus, la dilution amène le pH à 5,5 qui est le pH optimum de conservation de la B-12. L'extrait, ainsi prêt pour le dosage, peut être conservé à la glacière obscure pendant 8 à 15 jours.

c) Milieu de base

Le dosage consiste à apporter d'une part une quantité constante (soit 5 cm³) d'un milieu qui contient tous les éléments nécessaires à *E. coli* à l'exception de B-12 et d'autre part une quantité connue de B-12 ou des prises aliquotes d'extraits. On mesure la réponse de croissance du microorganisme en fonction de cette quantité de B-12.

Il est difficile d'apporter un par un les éléments du milieu. Aussi avons-nous essayé de grouper certains d'entre eux en tenant compte de leur compatibilité. D'autres, par contre, sont apportés de façon extemporanée.

1° SOLUTION D'ACIDES AMINÉS N° 1 : AAI.

200 mg de proline et 200 mg d'histidine sont dilués dans un peu d'eau bidistillée. On chauffe en présence de 1 cm³ d'HCl à 20 p. 100. Après solubilisation complète, on ajuste à 100 cm³. On répartit en flacons et on stérilise 17 minutes à 115°.

2° SOLUTION D'ACIDES AMINÉS N° 2 : AA2.

100 mg de glyocolle, 100 mg d'arginine, 100 mg d'acide glutamique et 4 g d'asparagine sont dilués dans un peu d'eau bidistillée. On chauffe en présence de 2,5 cm³ d'HCl à 20 p. 100. Après solubilisation complète, on ajuste à 100 cm³. On répartit en flacons et on stérilise 17 minutes à 115°.

3° SOLUTION DE TRYPTOPHANE.

Le tryptophane doit être préparé à part car il est détruit par l'autoclavage en milieu acide : 2 g de *dl*-tryptophane sont dilués dans un peu d'eau et chauffés à 70° environ. On ajoute alors exactement la quantité nécessaire d'HCl à 20 p. 100 pour obtenir une dissolution complète, on ajuste ensuite à 1 000 cm³. Ceci est nécessaire pour éviter la transformation du tryptophane en indol. Un bon moyen pour savoir si la solution de tryptophane est encore bonne, est de regarder sa couleur : une solution rose est à rejeter.

Cette solution est conservée à la glacière.

4° MÉLANGE SELS-GLUCOSE.

Il s'agit d'un mélange sec : 5 g de citrate neutre de sodium (C₆H₅O₇Na₃)₂, 11 H₂O, 10 g de sulfate neutre d'ammonium, 1 g de sulfate de magnésium, 7 H₂O et 100 g de glucose sont broyés finement et mélangés intimement. Ce mélange est conservé dans un flacon de verre foncé à la température ambiante.

5° LES PHOSPHATES, monopotassique et bipotassique, sont apportés séparément et extemporanément à l'état cristallisé car, en solution, on ne peut pas les stériliser et ils se polluent très vite ; en mélange avec le glucose, ils sont hygroscopiques.

Au moment du dosage on réalise le milieu de base, en apportant les quantités suivantes. :

	pour 10 tubes	par litre
AA1.....	2,5 cm ³	50 cm ³
AA2.....	5 cm ³	100 cm ³
Tryptophane.....	5 cm ³	100 cm ³
Glucose-sels.....	0,58 g	12 g
Phosphate monopotassique.....	0,15 g	3 g
Phosphate bipotassique.....	0,35 g	7 g
Eau bidistillée qqs.....	50 cm ³	1 000 cm ³

Le pH se trouve automatiquement réglé à 6,8 par les phosphates.

d) Solution étalon de B-12

On peut la préparer à partir de solutions titrées du commerce. Nous partons d'une solution à 10 γ par cm³. On en dilue 10 cm³ dans 1 000 cm³

d'eau bidistillée. On reprend 10 cm³ de cette dilution, on ajoute 4 mg de KCN et on ajuste à 100 cm³ avec de l'eau bidistillée. Dans un troisième temps, on pipette à nouveau 5 cm³ de cette solution qu'on amène à 100 cm³. On utilise donc finalement une solution à 0,5 m γ de B-12 et à 2 γ de KCN par cm³. La première dilution en présence de cyanure peut être conservée à la glacière comme solution stock pendant un mois.

e) Conduite du dosage

A chaque dosage il s'agit de procéder rigoureusement dans les mêmes conditions pour la solution étalon et les extraits correspondants (même milieu, mêmes température et durée de stérilisation, même ensemencement et mêmes durée et température d'incubation).

Dans une gamme de tubes 18 \times 180 mm, on répartit les quantités croissantes suivantes : 0 — 0,05 — 0,10 — 0,15 — 0,20 — 0,25 — 0,30 — 0,35 — 0,40 cm³ de la solution étalon de vitamine. Tous les points sont faits en double. On opère de même avec les extraits en utilisant seulement 5 doses différentes, par exemple (0,10 — 0,15 — 0,20 — 0,25 — 0,30) car il faut que les quantités de B-12 de l'extrait correspondent à la partie utilisable de la courbe. On ajoute dans chaque tube 5 cm³ du milieu de base.

f) Stérilisation

Les tubes ainsi préparés sont bouchés avec du coton et stérilisés 6 minutes à 120°. Pour le contrôle de cette stérilisation, on a réservé un tube qui ne sera pas ensemencé.

g) Préparation des inoculum

C'est le point le plus délicat et nous avons vu combien était importante la notion de densité microbienne. Aussi, si nous voulons avoir des résultats reproductibles, est-il nécessaire d'apporter un grand soin dans l'exécution d'inoculum normalisé. Nous cherchons à avoir une population microbienne non altérée par un traitement quelconque, se trouvant en phase de multiplication active et maintenue dans un milieu contenant le moins de vitamine B-12 possible. Aussi rejetons-nous la technique de centrifugation ; nous faisons pousser *E. coli* dans un milieu qui contient juste assez de B-12 pour sa croissance ; nous diluons cet inoculum dans du sérum physiologique au moment de l'emploi.

La préparation de l'inoculum se fait donc en plusieurs temps et repose sur le principe suivant : afin d'avoir toujours la même concentration microbienne des inoculum, il faut avoir une culture de départ dont

la densité optique soit constante. Pour cela on maintient *E. coli* en phase stationnaire (pas de multiplication) à la glacière.

Bouillon de culture pour inoculum : on dissout à chaud dans 1 000 cm³ d'eau bidistillée : 10 g de peptone, 10 g d'extrait de levure, 7 g de chlorure de sodium, 2,6 g de phosphate monopotassique, 7 g de phosphate bipotassique, 5 g de glucose et 25 cm³ d'extrait de foie ⁽¹⁾ en présence de charbon actif. Le charbon retient une grande partie de B-12 et, à l'ébullition, il se forme un précipité dont on doit débarrasser le milieu. Le filtrat est réparti d'une part dans des tubes (8 cm³), d'autre part dans des ballons (100 cm³).

Premier temps de la culture microbienne : le bouillon stationnaire. — On inocule à l'anse de platine un ballon de bouillon et on laisse se multiplier le microorganisme à l'étuve à 37° pendant 3 ou 4 jours, temps nécessaire pour que tout le glucose soit consommé. A partir de ce moment, le microorganisme ne se multiplie plus et on peut fort bien le conserver un mois à la glacière.

Deuxième temps : inoculum actif. — Au moment du dosage, on a besoin d'un microorganisme en phase de multiplication active. Aussi, trois heures avant le dosage, on ensemence un tube avec 10 gouttes de la culture stationnaire et on le place à l'étuve à 30°.

Troisième temps : dilution de l'inoculum actif. — Cet inoculum, au moment de l'emploi, est dilué dix fois dans du sérum physiologique.

h) **Insemencement**

Avec une pipette Pasteur, on apporte dans chaque tube de dosage préalablement refroidi, une goutte de l'inoculum ainsi préparé. Le dosage de B-12 dans l'inoculum montre qu'il contient de 0,5 à 1 mγ/cm³. Comme on le dilue dix fois et que l'on apporte une goutte dans chaque tube, la quantité de B-12 apportée dans chaque tube correspond à

$$\frac{0,5}{10 \times 20} = 0,0025 \text{ m}\gamma, \text{ quantité tout à fait négligeable.}$$

i) **Incubation**

Nous recommandons une incubation variant de 12 à 16 heures dans un bain-marie à 30°.

j) **Titration**

La réponse de croissance dans chaque tube est mesurée par néphélométrie à l'électrophotomètre de MEUNIER (écran vert).

(1) Extrait de foie Byla.

k) Calcul

On établit la courbe standard en portant en abscisses les $m\gamma$ de vitamine B-12 et en ordonnées les lectures correspondantes au photomètre. A l'aide de cette courbe, on détermine la teneur en B-12 des tubes contenant l'extrait à doser. A partir de ces résultats, on calcule la teneur de l'extrait grâce au facteur de dilution.

1) Validité de la méthode

La méthode que nous proposons est fidèle et donne des résultats reproductibles. En effet, lorsqu'on surcharge les extraits avec des quantités de B-12 pure, le calcul des résultats permet, dans la partie utilisable de la courbe, de retrouver le supplément apporté. De plus, les dosages successifs du même extrait nous donnent sensiblement les mêmes résultats.

TABLEAU X

Échantillon	$m\gamma/cm^3$ extrait			γ/g échantillon frais		
	1 ^{er} dosage	2 ^e dosage	3 ^e dosage	1 ^{er} dosage	2 ^e dosage	3 ^e dosage
Foie I.....	0,46	0,46	0,48	0,24	0,24	0,25
Foie II.....	0,38	0,42	—	0,31	0,34	0,31
Pénicillium.....	0,40	0,36	—	0,0495	0,0445	—
Jus de rumen.....	0,87	0,80	—	0,218	0,200	—
Fécès de rat.....	0,45	0,47	—	2,64	2,76	—

En résumé, la technique que nous proposons dérive de celle de BURKHOLDER qui utilise *E. coli* W ATCC 9637 souche 113-3. Cet organisme répond spécifiquement à la vitamine B-12. Il est légèrement sensible à la méthionine, mais à des doses 50 000 fois supérieures à celles de B-12. Outre des modifications de détails destinées à faciliter les dosages en série, les principaux perfectionnements que nous proposons intéressent : l'usage de CNK comme stabilisant de B 12 pendant l'autoclavage, les modalités d'extraction qui se fait à 120° pendant une demi-heure en présence d'un tampon acide acétique-acétate à pH 4,5, la préparation standard d'un inoculum basée sur la notion de densité microbienne et la durée de l'incubation. Nous croyons que la technique proposée présente des avantages de rapidité, de commodité, de sensibilité et de reproductibilité. Elle convient aux études que nous avons actuellement en cours. Néanmoins, si on désire l'appliquer à d'autres matériels, il serait bon de comparer ses résultats avec ceux que donne le dosage par *Ochromonas*, ce dernier organisme dosant les formes spécifiques de B-12 et non l'ensemble des Cobalamines.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les Établissements BYLA qui nous ont fourni gracieusement la vitamine B-12 ayant servi à nos essais.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ASCHKENASY (A.). — 1950, *Ann. Nutr. Alim.*, **4**, 141-167.
- (2) BACON (F.) et CHOW. — 1951, *J. Nutr.*, **43**, 323-343.
- (3) BARBER (M. A.). — 1908, *J. Infec. Diseases*, **5**, 379-400.
- (4) BECKWITH (T. D.) et GEARY (E. M.). — 1940, *J. Infec. Diseases*, **66**, 78-79.
- (5) BESSEL (C. J.), HARRISON (E.) et LEES (K. A.). — 1950, *Chem. E. Ind.*, 561.
- (6) BOXER et RICHARDS. — 1950, *Arch. Bioch.*, **29**, 75-84.
- (7) BRINK (N. G.), KUEHL (F. A.) et FOLKERS (K.). — 1950, *Science*, **112**, 354.
- (8) BRINK (N. G.) et FOLKERS (K.). — 1950, *J. American Chem. Soc.*, **72**, 4422.
- (9) BROQUIST (H. P.), STOCKSTAD (E. L. R.) et JUKES (T. H.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **185**, 399-409.
- (10) BURKHOLDER (R. R.). — 1951, *Science*, New York, **114**, 459.
- (11) CAPPES (B. F.), HOBBS (N. L.) et FOX (S. H.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **178**, 517-518.
- (12) CHRISTIANSEN (J.). — 1918, *Z. Physiol. Chem.*, **102**, 275-305.
- (13) COATES (M. E.), FORD (J. E.), HARRISON (G. F.), KON (S. K.), PORTER (J. W. G.), CUTHBERTSON (W. F. J.), et PELGLER (H. F.). — 1951, *Biochem. J.*, **49**, IXVII.
- (14) COATES (M. E.), FORD (J. E.), HARRISON (G. F.), KON (S. K.), SHEP-HEAD (E. E.) et WILBY (F. W.). — 1952, *Brit. J. Nutr.*, **6**, 75.
- (15) COATES (M. E.), HARRISON (G. F.) et KON (S. K.). — 1951, *Analyst*, **76**, 146.
- (16) COATES (M. E.), HARRISON (G. F.) et KON (S. K.). — 1950, *Biochem. J.*, **46**, VII-VIII.
- (17) COATES (M. E.), HARRISON (G. F.), KON (S. K.) et PORTER (J. W. G.). — 1953, *Brit. J. Nutr.*, **7**, 319.
- (18) COMBS (G. F.), CARLSON (C. W.), MILLER (R. F.), PEELER (H. T.), NORRY (L. E.) et HEUSER (G. F.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **182**, 727-737.
- (19) COOPERMANN (J. M.), DRUCKER (R.) et TABENKIN (B.). — 1951, *J. Biol. Chem.*, **191**, 135-142.
- (20) COUCH (J. R.) et OLCESE (O.). — 1950, *J. Nutr.*, **43**, 337-346.
- (21) COWLES (P. B.). — 1940, *Yale J. Biol. Med.*, **12**, 697-704.
- (22) CURRAN (H. R.) et EVANS (F. R.). — 1942, *J. Bact.*, **43**, 125-139.
- (23) CUTHBERTSON (W. F. J.) et LESTERSMITH (E.). — 1949, *Biochem. J.*, **44**, V.
- (24) CUTHBERTSON (W. F. J.), PELGLER (H. F.) et LLOYD (J. T.). — 1951, *Analyst*, **76**, 133.
- (25) DANIEL (L. J.), PEELER (H. T.), NORRIS (L. C.) et SCOTT (M. L.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **177**, 917-926.
- (26) DANIEL (L. J.), GARDINER (M.) et OTTEY (L. J.). — 1953, *J. Nutr.*, **50**, 275-290.
- (27) DAVIS (B. D.) et MINGIOLO (E. S.). — 1950, *J. Bact.*, **60**, 17.
- (28) DERNBY (K. G.) et NASLUND (C.). — 1923, *Z. Immun.*, **35**, 450-454.

- (29) DIETRICH (L. S.), NICHOL (C. A.), MONSON (W. J.) et ELVEHJEM (C. A.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **181**, 915-920.
- (30) DOZOIS (K. P.), CARR (C. J.) et KRANTZ (J. C.). — 1935, *J. Bact.*, **30**, 599-604.
- (31) DOZOIS (K. P.), CARR (C. J.) et KRANTZ (J. C.). — 1935, *J. Bact.*, **30**, 189-192.
- (32) DOZOIS (K. P.), CARR (C. J.), KRANTZ (J. C.), HACHTEL (F.) et BECK (F. E.). — 1936, *J. Bact.*, **32**, 499-503.
- (33) den DOOREN de JONG (L. E.). — 1926, *Bijdrage tot de Kennis van het Mineralisatieproces*, Rotterdam Dissertation Nijgk and van Dittmar.
- (34) DUMAS (J.), BORDET (P.), LAPORTE (R.), LEPINE (P.), POCHON (J.) et PREVOT. — *Bact. Méd.*, 1951, p. 374-378. (Edition Médicale Flammarion.)
- (35) EISENBERG (P.). — 1918, *Central. Bact. J. Abt. Orig.*, **82**, 69-207.
- (36) ELLIS, PETROW, BEAVEN, HOLIDAY et JOHNSON. — 1950, *J. Pharm.*, **2**, 73.
- (37) ERIKSON (F. J.) et FABIAN (F. W.). — 1942, *Food Research*, **7**, 68-79.
- (38) FALK (I. S.). — 1923, *Bact. Abst.*, **7**, 33-50, 87-105, 133-147.
- (39) FANTES (K. H.) et IRELAND (D. M.). — 1950, *Biochem. J.*, **46**, XXXIV, XXXV.
- (39 bis) F. D. A., 141, 216, a-(8).
- (40) FIELD (J. T.) et POE (C. E.). — 1940, *J. Biol. Chem.*, **132**, 473-476.
- (41) FORD (J. E.) et PORTER (J. W. G.). — 1953, *Brit. J. Nutr.*, **7**, 326-336.
- (42) FORD (J. E.). — 1953, *Brit. J. Nutr.*, **7**, 299-306.
- (43) FROST (D.), FRICKE (H.) et SPRUTH (H.). — 1953, *J. Nutr.* **49**, 107.
- (44) GIRDWORD (R. H.). — 1949, *Lancet*, **257**, 356.
- (45) GRAHAM-SMITH (G. S.). — 1920, *J. Hyg.*, **19**, 134-203.
- (46) GREENE (R. D.), BROOK (A. J.) et Mc. CORMACK (R. B.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **178**, 999.
- (47) GROSCHKE (A. C.), THORNBURN (L. A.), MAC MILLEN (W. N.), LUECKE (R. W.) et THORP (F.). — 1950, *Quart. Bull. Mich. Agric. Exp. Sta.*, **32**, 503.
- (48) GRUNN et MENASSE. — 1950, *Experientia*, **6**, 263.
- (49) HARRISON (E.), LEES (K. A.) et WOOD (F.). — 1951, *Analyst.*, **76**, 696.
- (50) HENDLIN (D.) et SOARS (M.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **188**, 603.
- (51) HERRINGTON (B. L.). — 1934, *J. Bact.*, **28**, 177-179.
- (52) HOEKSTRA (W. J.), POPE (A. L.), PHILLIPS (P. H.). — 1952, *J. Nutr.*, **48**, 421.
- (52 bis) HOFFMANN (C. E.), STOKSTAD (E. L. R.), FRANKLIN (A. L.) et JUKES (T. H.). — 1948, *J. Biol. Chem.*, **176**, 1465.
- (53) HOFFMANN (C. E.), STOKSTAD (E. L. R.), FRANKLIN (A. L.) et JUKES (T. H.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **181**, 635.
- (54) HUNTINGTON (E.) et WINSLOW (C. E. A.). — 1937, *J. Bact.*, **33**, 123-144.
- (55) HUTNER (S. H.) et BJERKNES (C. A.). — 1948, *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, **67**, 393.
- (56) HUTNER (S. H.), PROVASOLI (L.), STOKSTAD (E. L. R.), HOFFMANN (C. E.), BELT (M.), FRANKLIN (A. L.) et JUKES (T. H.). — 1949, *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, **70**, 118.
- (57) JENNISON (M. W.). — 1935, *J. Bact.*, **30**, 603-629.
- (58) JOHANSSON (K. R.). — 1951, *Bact. Proc.*, 146.
- (59) JOHANSSON (K. R.), PETERSON (G. E.), ELLIOT (C. D.). — 1953, *J. Nutr.*, **49**, 135.
- (60) KACZKA (E. A.), WOLF, KUEHL et FOLKERS (K.). — 1950, *Science*, **112**, 354-355.
- (61) KAUFFMANN (F.). — 1951, *Enterobacteriaceae*, Engar Munksgaard Publisher Copenhagen.

- (62) KERESZTEZI (J. C.) et SILVERMAN (M.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **183**, 473.
- (63) KITAY (E.), Mc NUTT (W. S.) et SNELL (E. E.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **177**, 993.
- (64) KODITSCHKEK (L. K.) et CARPENTER (K. J.). — 1948, *Biochem. J.*, **43**, V.
- (65) KOSER (S. A.). — 1923, *J. Infect. Diseases*, **23**, 377.
- (66) KOSER (S. A.). — 1923, *J. Bact.*, **8**, 493-520.
- (67) KOSER (S. A.) et RETTGER (L. F.). — 1912, *J. Infect. Diseases*, **24**, 301.
- (68) LENS (J.), WIJMENGA (H. G.), WOLFF (R.), WINKLER (K. C.) et DE HAAN (P. J.). — 1952, *Biophys. Biochem. Acta*, **8**, 56.
- (69) LEWINE (A. S.) et FELLERS (C. R.). — 1940, *J. Bact.*, **39**, 499.
- (70) LEWIS (U. G.), REGISTER (U. D.) et ELVEHJEM (C. A.). — 1949, *Proc. Soc. Biol. Med.*, **71**, 509-511.
- (71) LEWIS (U. J.), REGISTER (U. D.), THOMPSON (H. T.) et ELVEHJEM (C. A.), 1949, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**, 472.
- (72) LODGE (R. M.) et HINSHELLWOOD (C. N.). — 1943, *J. Chem. Soc.*, 208-221.
- (73) MAC GINNIS (J.), STEVENS (J. M.) et GROVES (K.). — 1947, *Poultry Sci.*, **26**, 432.
- (74) MINERVI (R.). — 1898, *Hyg. Infect. Kr.*, **29**, 117-147.
- (75) MITCHELL (N. B.) et LEWINE (M.). — 1938, *J. Bact.*, **36**, 587.
- (76) NOVAK (A. F.) et HAUGE (S. M.). — 1948, *J. Biol. Chem.*, **174**, 647-651.
- (77) NUNHEIMER (T. D.) et FABIAN (F. W.). — 1940, *Am. J. Pub. Health.*, **30**, 1040-1049.
- (78) PEELER (H. I.) et NORRIS (L. C.). — 1951, *J. Biol. Chem.*, **188**, 75.
- (79) PEELER (H. I.), YACOWITZ (H.) et NORRIS (L. C.). — 1949, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**, 515.
- (80) PENFOLD (W. J.). — 1914, *J. Hyg.*, **14**, 215-241.
- (81) PIERCE (J. V.), PAGE (A. C. JR.), STOKSTAD (E. L. R.) et JUKES (T. H.). — 1949, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 952.
- (82) POE (C. E.) et KLEMME (D. E.). — 1935, *J. Biol. Chem.*, **109**, 43-46.
- (83) POE (C. E.) et KLEMME (D. E.). — 1935, *J. Biol. Chem.*, **143**, 655-662.
- (84) RAHN (O.) et CONN (J. E.). — 1944, *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 185-187.
- (85) REGISTER (U. D.), RUEGARMER (W. R.) et ELVEHJEM (C. A.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **177**, 129-134.
- (86) REID (J. O.). — 1932, *Am. J. Hyg.*, **16**, 540-556.
- (87) RICKES (E. L.), BRINK (N. G.), KONINSZY (F. R.), WOOD (F. R.) et FOLKER (K.). — 1948, *Science*, **107**, 396.
- (88) RICKES (E. L.), BRINK (N. G.), KONINSZI (F. R.), WOOD (F. R.) et FOLKER (K.). — 1948, *Science*, **108**, 134.
- (89) RICKES (E. L.), BRINK (N. G.), KONINSZI (F. R.), WOOD (F. R.) et FOLKER (K.). — 1948, *Science*, **108**, 634.
- (90) ROBBINS (W. J.), HERVEY (A.) et STEBBINS (M. E.). — 1951, *Bull. Torrey Bot. Club.*, **77**, 423.
- (91) ROBINSON (F. A.). — 1951, *The Vitamin B Complex* — Chapman and Hall L. T. D.-London.
- (92) ROSS (G. I. M.). — 1950, *Nature*, **166**, 270.
- (93) SCHEID (H. E.) et SCHWEIGERT (B. S.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **185**, 1.
- (94) SCHEID (H. E.) et SCHWEIGERT (B. S.). — 1951, *J. Biol. Chem.*, **193**, 299.
- (95) SCHEID (H. E.), ANDREWS (H. M.) et SCHWEIGERT (B. S.). — 1952, *J. Nutr.*, **47**, 601.
- (96) SCHWEIGERT (B. S.), SCHEID (H. E.) et MARQUETTE. — 1951, *Fed. Proc.*, **10**, 394.
- (97) SHAW (G. E.). — 1949, *Nature*, **164**, 186.
- (98) SHIVE (W.), RAVEL (J. M.) et EAKIN (R. E.). — 1948, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2614.

- (99) SHILLINGLAW (C. A.) et LEWINE (M.). — 1943, *Food Research*, **8**, 464-476.
- (100) SHORB (M. S.). — 1948, *Science*, **107**, 397.
- (101) SHORB (M. S.) et BRIGGS. — 1948, *J. Biol. Chem.*, **176**, 1463.
- (102) SKEGGS (H. E.), HUFF (J. W.), WEIGHT (L. D.) et BOSSHARDT (D. K.). — 1948, *J. Biol. Chem.*, **176**, 1459.
- (103) SKEGGS (H. E.), NEPPLE (H. M.), VALENTIK (K. A.), HUFF (J. W.) et WRIGHT (L. D.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **184**, 211.
- (104) SNELL (E. E.), KITAY (E.) et NUTT (W. S.). — 1948, *J. Biol. Chem.*, **175**, 474.
- (105) STOKSTAD (E. L. R.), PAGE (A. C. Jr.), PIERCE (J.), FRANKLIN (A. L.), JUKES (T. H.), HEINLY (R. W.), EPSTEIN (M.) et WELSCH (A. D.). — 1948, *J. Lab. Chem. Med.*, **33**, 860.
- (106) STOKSTAD (E. L. R.), DORNBUSH (B. L.), FRANKLIN (A. L.), HOFFMANN (C. E.), HUTCHINGS (B. L.) et JUKES (T. H.). — 1949, *Fed. Proc.*, **8**, 257.
- (107) STOKSTAD (E. L. R.), JUKES (T. H.), PIERCE (J.), PAGE (A. C. Jr.) et FRANKLIN (A. L.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **180**, 647.
- (108) TERNBERG (J. L.) et EAKIN (R. E.). — 1949, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 3858.
- (109) THOMPSON (H. T.), DIETRICH (L. S.) et ELVEHJEM (C. A.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **177**, 129.
- (110) THOMPSON (H. T.), DIETRICH (L. S.) et ELVEHJEM (C. A.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **184**, 175.
- (111) TILLEY (F. N.) et SCHAEFFER (J. M.). — 1928, *J. Bact.*, **16**, 279-285.
- (112) TWORT (F. W.). — 1907, *Proc. Roy. Soc. London*, **79**, p. 329-336.
- (113) WALKER (H. H.), WINSLOW (C. E. A.). — 1932, *J. Bact.*, **24**, 209-241.
- (114) WARING (W. S.) et WERMANN (C. H.). — 1944, *Arch. Biochem.*, **4**, 75-87.
- (115) WIJMEGA (H. G.), VEER (W. L. S.) et LENS (J.). — 1950, *Biophys., Biochem. Acta.*, **6**, 229.
- (116) WINSLOW (C. E. A.) WALKER (H. H.) et SUTERMEISTER (M.). — 1932, *J. Bact.*, **24**, 185-208.
- (117) WINSLOW (C. E. A.), et WALKER (H. H.). — 1939, *Bact. Rev.*, **3**, 147-186.
- (118) WINSTEN (W. A.) et EIGEN (E.). — 1949, *J. Biol. Chem.*, **181**, 109.
- (119) WINSTEN (W. A.), EIGEN (E.) et OSER. — 116th Meet. Amer. Chem. Soc. Atlantic City, 18 sept. 1949.
- (120) WOLF (D. E.), WOOD (F.) et FOLKERS (K.). — 116th Meet. Amer. Soc. Atlantic City, 18 sept. 1949.
- (121) WOODRUFF (H. B.) et FOSTER (C. J.). — 1950, *J. Biol. Chem.*, **183**, 569.
- (122) WOODS. — 1949, *Borden's Rev. Nutr. Research*, **10**, 12.
- (123) WRIGHT (L. D.), SKEGGS (A. R.) et HUFF (J. W.). — 1948, *J. Biol. Chem.*, **175**, 475.
- (124) YOUNG (E. G.), BEGG (R. W.) et PENTZ (E. I.). — 1944, *Arch. Biochem.*, **5**, 121-136.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVERIE.

I. N. R. A.
BIBLIOTHEQUE UO 95906
DOMAINE DE CROUELLE
63039
CLERMONT-FD CEDEX 2

Édition de la Société BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 8-9-1954.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1954

N^o d'impression : 409